

Ikke-levende vaksine mot influensa:  
Betydning av  $\beta$ -glukan i partikulær form for  
beskyttelse mot infeksjon



av

Veronika Smith

Hovedfagsoppgave ved avdeling for mikrobiologi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

2004

## **Forord**

Denne hovedoppgaven er utført ved Norsk Folkehelseinstitutt og er en del av et større forskningsprosjekt i utvikling av en nasal vaksine mot influensa. Veileder har vært prof. dr. med. Bjørn Haneberg.

Jeg vil gjerne takke alle som har hjulpet meg med utførelsen av denne oppgaven.

Takk til Bjørn Haneberg for god veiledning, gode råd og oppmuntring.

Takk til personalet på dyrestallen for hjelp til prøvetakning og arbeid med musene, Liba Janakova for god hjelp i oppstarten og introduksjon til arbeid med mus, Brit W. Iversen og Ida Bjørnson-Hansen for hjelp med analyse av virusprøver og Inger Lise Haugen for hjelp med labarbeid og praktiske råd.

Takk til Nina Løvrak for godt samarbeid og bra håndtering av sprøyten på dyrestallen.

I tillegg vil jeg takke min far for korrekturlesning, profesjonelle råd og ekstra veiledning.

Oslo, november 2004

Veronika Smith

<b>1.</b>	<b>SAMMENDRAG</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>INNLEDNING</b>	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Influenza</b>	<b>7</b>
2.1.1	Sykdom	7
2.1.2.	Influensaviruset	8
<b>2.2.</b>	<b>Kroppens forsvar mot infeksjon</b>	<b>8</b>
2.2.1.	Det medfødte immunforsvaret	9
2.2.2.	Det adaptive immunforsvaret	10
<b>2.3.</b>	<b>Vaksiner</b>	<b>13</b>
2.3.1.	Influensavaksine	13
2.3.2.	Slimhinnevaksine	14
2.3.3.	Adjuvans	14
<b>2.4.</b>	<b>Betaglukan</b>	<b>15</b>
<b>2.5.</b>	<b>Hensiktene med forsøket</b>	<b>16</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALER OG METODER</b>	<b>18</b>
<b>3.1.</b>	<b>Kort oversikt over forsøket</b>	<b>18</b>
<b>3.2.</b>	<b>Forsøksdyrene</b>	<b>21</b>
3.2.1.	Dyremodell	21
3.2.2.	Generelt om musene	21
3.2.3.	Fargemerking	21
3.2.4.	Øremerking	22
<b>3.3.</b>	<b>Forberedelse av vaksineløsningen</b>	<b>23</b>
3.3.1.	Inaktivering av virus	23
3.3.2.	Totalprotein i virus	24
3.4.1.	Vasking av MacroGard	25
<b>3.5.</b>	<b>Tillaging av vaksiner og MacroGard</b>	<b>26</b>
3.5.1.	Vaksiner	26
3.5.2.	MacroGard	28
<b>3.6.</b>	<b>Administrering av vaksiner og MacroGard</b>	<b>30</b>
<b>3.7.</b>	<b>Smitte</b>	<b>30</b>
3.7.1.	Tillaging av smitteløsning:	31
3.7.2.	Smitte av musene	31
<b>3.8.</b>	<b>Innsamling av prøvemateriale og preparering av prøver</b>	<b>32</b>
3.8.1.	Veing	32
3.8.2.	Temperaturmåling	32
3.8.4.	Saliva	33
3.8.5.	Neseskylling	34
3.8.3.	Blod	35
<b>3.9.</b>	<b>Analyse av prøvemateriale</b>	<b>37</b>

3.9.1.	ELISA	37
3.9.2.	Definering av standard	40
3.9.3.	Virus i neseskyllevæsken	41
<b>3.10.</b>	<b>Statistiske metoder og grafisk presentasjon</b>	<b>42</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTATER</b>	<b>43</b>
<b>4.1.</b>	<b>Observasjon av musene</b>	<b>43</b>
<b>4.2.</b>	<b>Mål på klinisk sykdom</b>	<b>43</b>
<b>4.3.</b>	<b>De registrerte måleparametere</b>	<b>45</b>
4.3.1.	Vektmålinger – alle grupper	45
4.3.2.	Temperaturmålinger – alle grupper	46
4.3.3.	IgG i serum – alle grupper	47
4.3.4.	IgA i saliva – alle grupper	48
4.3.5.	Virustiter i neseseekret – alle grupper	48
<b>4.4.</b>	<b>Effekt av IgG på klinisk sykdom</b>	<b>50</b>
<b>4.5.</b>	<b>Sammenheng mellom virustiter i neseskyllevæske og klinisk sykdom</b>	<b>52</b>
<b>4.6.</b>	<b>Effekt av intranasal vaksine vs. subcutan vaksine</b>	<b>54</b>
<b>4.7.</b>	<b>Effekt av MacroGard intranasalt</b>	<b>55</b>
4.7.1.	MacroGard i blanding med intranasal vaksine	55
4.7.2.	MacroGard intranasalt med subcutan vaksine	57
4.7.3.	MacroGard intranasalt uavhengig av vaksine	59
<b>4.8.</b>	<b>Effekt av MacroGard peroralt</b>	<b>61</b>
4.8.1.	MacroGard peroralt i kombinasjon med intranasal vaksine	61
4.8.2.	MacroGard peroralt i kombinasjon med subcutan vaksine	62
4.8.3.	MarcoGard peroralt uten vaksine	64
<b>5.</b>	<b>DISKUSJON</b>	<b>66</b>
<b>5.1.</b>	<b>Kriterier for klinisk sykdom</b>	<b>66</b>
<b>5.2.</b>	<b>Statistisk signifikans</b>	<b>67</b>
<b>5.3.</b>	<b>Effekt av vaksinen</b>	<b>67</b>
<b>5.4.</b>	<b>Effekt av MacroGard</b>	<b>68</b>
<b>6.</b>	<b>KONKLUSJON</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>KILDER</b>	<b>72</b>
<b>8.</b>	<b>Vedlegg</b>	<b>75</b>

# 1. SAMMENDRAG

De siste årene er betaglukan i partikulær form blitt brukt som fôrtilskudd hos husdyr, da det er vist at det gir større vektøkning og økt grad av overlevelse. Forsøk ved Norsk Folkehelseinstitutt har vist at betaglukan gitt i blanding med intranasal vaksine mot influensa har ført til redusert immunrespons sammenlignet med responsen som ble oppnådd uten betaglukan. Vi ville i denne oppgaven undersøke om det er noen sammenheng mellom et dempet immunforsvar og beskyttelse mot smitte. I tillegg ønsket vi å se om intranasal vaksiner og subcutan vaksiner hadde forskjellig effekt på antistoffproduksjon og sykdom etter smitte, og hvorvidt ulike administrasjonsmåter av betaglukan kunne påvirke effekten av vaksinene. Vi ønsket også å vurdere om kroppsvekt og kroppstemperatur kunne brukes som mål på klinisk sykdom.

Forsøket ble satt opp ved å bruke ni grupper med mus, seks mus i hver gruppe, som fikk forskjellige kombinasjoner av vaksine og betaglukan. Tre grupper fikk intranasal vaksine, enten alene, sammen med betaglukan intranasalt eller sammen med betaglukan peroralt over tid. Tre andre grupper fikk subcutan vaksine, også her enten alene, sammen med intranasal betaglukan eller sammen med peroral betaglukan over tid. De tre resterende gruppene ble ikke vaksinert, men én av dem fikk betaglukan peroralt over tid, i tillegg til at den i likhet med de vaksinerte gruppene, ble smittet med influensavirus. Én gruppe til ble smittet, denne fungerte som positiv kontroll og fikk ingen behandling utover smitte. Den siste gruppen fungerte som negativ kontroll og ble verken behandlet eller smittet. For å kunne bedømme effekten av vaksiner og betaglukan, ble det før smitte tatt prøver av blod og saliva for måling av IgG- og IgA-antistoffkonsentrasjoner. For å se på beskyttelse mot infeksjon ble virusmengden i nesekyllevæske bestemt, og for å registrere mulige tegn på klinisk sykdom ble musenes vekt og temperatur målt før og etter smitte. Vekt ble - i motsetning til temperatur- funnet å være en egnet parameter til bestemming av grad av sykdom.

Forsøket viste at den tillagede vaksinen gav relativt dårlig antistoffproduksjon, og derfor sannsynligvis var for svak. Likevel hadde vaksinen effekt idet den økte immunresponsen og beskyttet mot sykdom. Det ble funnet at IgG-antistoff i serum beskyttet mot sykdom.

Betaglukan viste seg å ha en modulerende (dempende) effekt på IgG-nivået i serum når det ble gitt enten intranasalt eller peroralt sammen med intranasal vaksine. Denne effekten ble ikke vist for betaglukan gitt sammen med subcutan vaksine. Til tross for at betaglukan gitt sammen med intranasal vaksine reduserte antistoffkonsentrasjonen hos musene, førte dette imidlertid ikke til noen reduksjon av musenes evne til å motstå sykdom, hvilket kan tyde på at betaglukan i seg selv hadde en beskyttende effekt. Betaglukan gitt peroralt alene viste ingen slik effekt på beskyttelse mot sykdom. Det synes derfor som at betaglukan kan ha en effekt på det spesifikke immunforsvaret ved slimhinnevaksinering. Det gjenstår å finne ut om dette kan skyldes påvirkning av cellulær immunitet.

## 2. INNLEDNING

### 2.1 Influenza

#### 2.1.1 Sykdom

Influenza er en virussykdom som årlig rammer store deler av befolkningen. På den nordlige halvkule opptrer den som epidemier i tidsrommet desember – april. Viruset endrer seg hele tiden og nye varianter opptrer årlig. En sjelden gang oppstår det globale epidemier, såkalte pandemier. De siste store pandemiene er ”Spanskesyken” (1918-19), ”Asiasyken” (1957), ”Hong Kong-syken” (1968) og ”russerinfluenzaen” i 1977. Under ”Spanskesyken” døde det 25-40 millioner mennesker på verdensbasis, hvorav ca. 15000 i Norge. Årlig dør det anslagsvis 1500 personer, i hovedsak eldre, under en vanlig influensasessong i Norge (1).

De typiske symptomene for influensa er sår hals, høy feber, frysninger, hodepine samt muskel- og leddsmarter. Tørrhoste og slapphet er også svært vanlig. Influenza spres ved dråpesmitte, for eksempel ved hoste, og siden viruset kan overleve en periode utenfor verten kan det også spres ved kontaktsmitte (2). Virus infiserer celler i luftveiene, og symptomene oppstår når epitelceller i luftveiene dør, sannsynligvis fra angrep av T-celler (3). En annen faktor kan være stoffer (interleukiner) som dannes i prosessen (4).

Tiden fra man smittes til symptomene viser seg er 1-3 dager, og man er etter dette smittefarlig i 3-5 dager fremover. To til tre dager etter symptomdebut vil vanligvis temperaturen falle og allmenntilstanden bedres, og etter en uke er influensasymptomene borte.

Influenzaviruset kan imidlertid i tillegg gi alvorlige sykdommer som lungebetennelse og hjernebetennelse (2, Bjørn Haneberg, personlig meddelelse). Dessuten kan en virusinfeksjon som influensa disponere for sekundær bakterieinfeksjon, og det kan derfor oppstå komplikasjoner. Den vanligste komplikasjonen til influensa er lungebetennelse, men også sykdommer som hjernehinnebetennelse og myokarditt kan oppstå. Dette er hovedsakelig et problem for personer som befinner seg i følgende risikogrupper:

- Voksne og barn med alvorlige luftveissykdommer
- Voksne og barn med kroniske hjerte-karsykdommer
- Voksne og barn med nedsatt immunforsvar
- Beboere på alders og sykehjem
- Personer som er 65 år eller eldre

Disse gruppene blir anbefalt å vaksinere seg mot influensa (5).

### 2.1.2. Influenzaviruset

Influenzavirus tilhører familien orthomyxoviridae, og deles inn i tre grupper: A, B og C. Videre klassifiseres type A virus inn i subgrupper basert på forskjeller i antigenene hemagglutinin (H) og neuramidase (N) i proteinkappen. 15 forskjellige hemagglutinintyper og ni forskjellige neuramidasetyper er registrert for influensavirus A, mens det for influensavirus B bare finnes én av hver type (6). Tre influensa A virus subgrupper er epidemiske hos mennesker, H1N1, H2N1 og H3N2 (3). Endringer av disse antigenene skjer hyppig og fører til at det stadig oppstår nye epidemier. Små endringer kalles ”antigen drift” og skyldes små mutasjoner i antigenene H og N. Dette skjer stort sett årlig med influensa A virus, sjeldnere med B virus, og er ikke påvist hos C virus. De fleste influensaepidemiene skyldes A og B virus. For influensa virus A kan det også inntre store forandringer, såkalt ”antigen shift”, og det er gjerne dette som forårsaker de store pandemiene. ”Antigen shift” oppstår når influensavirus A fra fugler eller pattedyr rekombineres med influensavirus A fra mennesker. Dette kan skje når mennesker og dyr lever tett, og man blir smittet med både dyrevirus og menneskevirus samtidig. Det oppstår et helt ”nytt” virus som det ikke finnes noen immunitet i befolkningen mot (6,7,8).

## 2.2. Kroppens forsvar mot infeksjon

Kroppens forsvar mot infeksjon er et sammensatt og effektivt system. Det består av både en medfødt og en adaptiv del som samarbeider og kompletterer hverandre. Komponentene i



det medfødte immunforsvaret er alltid til stede og kan derfor reagere raskt på en infeksjon. Det medfødte immunforsvaret er uspesifikt, dvs. ikke rettet mot en spesiell infeksjon, men er ofte tilstrekkelig for banale infeksjoner, og de fleste patogener blir eliminert av det medfødte immunforsvaret. Enkelte ganger er dette imidlertid ikke nok, og kroppen må ty til det mer spesialiserte adaptive eller ervervede immunforsvaret. Den medfødte del av forsvaret sørger derfor for at det sendes ut signaler som får det adaptive immunforsvaret til å ruste opp og komme til unnsetning. Som navnet indikerer, kan det adaptive immunforsvaret tilpasse seg en spesifikk infeksjon ved å "huske" det agens som forårsaket infeksjonen og sørge for et kraftigere forsvar ved neste gangs infeksjon (sekundær immunrespons).

### 2.2.1. Det medfødte immunforsvaret

I første linje utgjøres det medfødte immunforsvaret av fysiske og kjemiske barrierer. Hud og slimhinneepitel utgjør en fysisk overflate det er vanskelig å trenge gjennom og kalles ofte den passive del av det medfødte immunforsvar. På slimhinnene er også slimlaget (mucus) en del av beskyttelsen. Det hindrer mikrober å komme i kontakt med epitelcellene og inneholder også antibakterielle komponenter, defensiner, som skilles ut fra epitelcellene. Andre kjemiske barrierer er blant annet magesyre og enzymer i tårer og spytt.

Dersom en infeksjon likevel skulle oppstå, vil forskjellige hvite blodceller samt andre komponenter i det medfødte immunforsvaret initiere en inflammatorisk respons på infeksjonsstedet (den aktive del av det medfødte immunforsvaret). Under en inflammasjon nøytraliseres og fjernes patogener ved hjelp av en rekke forskjellige metoder:

- Økt blodtilstrømming og karpermeabilitet bringer flere antimikrobielle komponenter og effektorceller til infeksjonsstedet.
- Økt temperatur stimulerer inflammasjonsprosessen og kan inhibere mikrobiell vekst.
- Fibrinklumper kan hindre spredning av patogener.
- Fagocytter samles på infeksjonsstedet og eliminerer patogener.

Den såkalte alternative veien og lektinveien i komplementsystemet er deler av det medfødte immunforsvaret, og er blant de første til å reagere under en infeksjon. Komplementsystemet er en samling proteiner som er til stede i kroppen til enhver tid, men må aktiveres for å sette i gang kaskaden som fører til bekjempelse av mikrober. Den alternative veien aktiveres ved gjenkjennelse av overflatemolekyler på bakterier og sopp, som for eksempel lipopolysakkarider og endotoxiner, mens lektinveien aktiveres av gjenkjennelse av mannose (3). Komplement bekjemper infeksjon på tre forskjellige måter; ved merking av mikrober for fagocytose (opsonering), ved direkte angrep på celler via et poredannende kompleks, og ved å styre immunceller til infeksjonsstedet (kjemotakse) (9).

Makrofager og neutrofile granulocytter er fagocyterende celler. Fagocytter gjenkjenner generelle strukturer som finnes på en rekke patogener, blant annet overflatemolekyler på bakterier og dobbeltrådet RNA, via "toll-like" reseptorer (9). Makrofager finnes i vev overalt i kroppen, og vil derfor være de første cellene til å sette i gang en immunrespons. I tillegg til å fagocytosere patogener, skiller makrofager ut flere ulike cytokiner. Cytokiner er polypeptidmolekyler som har til oppgave å sørge for kommunikasjon mellom ulike celler og som virker via overflatereseptorer på cellene. I forbindelse med infeksjon kan cytokinene "alarmere" det adaptive immunforsvaret og rekruttere andre effektorceller til infeksjonsstedet. Neutrofile granulocytter finnes til vanlig kun i blodet, men migrerer til vev når det er oppstått en skade (10). Andre viktige celler i det medfødte immunforsvaret er "Natural Killer" (NK) celler som spesifikt gjenkjenner virusinfiserte celler. NK-celler kan angripe de virusinfiserte cellene direkte, og i likhet med makrofagene kan de også skille ut cytokiner som aktiverer det adaptive immunforsvaret.

### 2.2.2. Det adaptive immunforsvaret

Der det medfødte immunforsvaret reagerer umiddelbart på en infeksjon, kan det ta 5 – 10 dager før det adaptive immunforsvaret er klart til aksjon (9). Det adaptive immunforsvaret er i stadig utvikling og streber etter å få et bredest mulig utvalg av reseptorer mot flest mulig antigener. Mens fagocytene i det medfødte immunforsvaret har uspesifikke reseptorer som binder seg til ulike infeksjonsagens, har hver enkelt celle i det adaptive immunforsvaret en antigen-spesifikk reseptor.

Det adaptive immunforsvaret består av en cellulær og en humoral del. Effektorcellene i den cellulære responsen er T-lymfocytter. Bokstaven T står for thymus fordi cellene, som produseres i den røde benmargen, ferdigutvikles eller modnes i thymus. For at en T-celle skal gjenkjenne et antigen, må antigenet først fagocyteres og presenteres av makrofager og dendrittceller fra det medfødte immunforsvaret eller av B-lymfocytter – effektorcellene i den humorale delen av det adaptive immunforsvaret. T-cellens antigenreseptor må være kompatibel med både det presenterte antigenet og reseptorer på den antigenpresenterende cellen. Det finnes tre typer T-celler; T-hjelpeceller (CD4), T-effektorceller (CD8) og T-huskeceller eller hukommelsesceller (se senere). Når T-cellene er aktivert, reagerer de ulike typene på forskjellig måte. CD4-celler kan sende ut signaler som aktiverer makrofager og derved det medfødte immunforsvaret, eller de kan sende ut andre signaler som aktiverer B-lymfocytter (og derved starte produksjon av antistoffer, se nedenfor). Hvilke signaler som sendes ut avhenger av type infeksjon og andre faktorer i nærmiljøet. CD8-celler kalles også cytotoksiske celler og virker ved å sekretere proteiner kalt cytotoksiner som fører til lysis og død av den infiserte cellen.

Den humorale del av det adaptive immunforsvaret utgjøres av antistoffer som produseres av B-lymfocytterne eller B-cellene. Disse cellene dannes og modnes i den røde benmargen, derav betegnelsen B (for ”bone marrow”). B-cellene har i likhet med T-cellene reseptorer på overflaten som gjenkjenner spesifikke strukturer (antigener). På B-celler er disse reseptorene formet som en Y, og består av en konstant region (Fc) og to variable regioner (Fab) hvor bindingsetene for antigener sitter. Før B-cellen møter et kompatibelt antigen og aktiveres, er denne reseptoren (immunglobulin) bundet til membranen i cellen. Etter aktivering stimuleres cellen til proliferering og differensiering til plasmaceller eller hukommelsesceller. Plasmacellene har som eneste jobb å sekretere immunglobulin av samme spesifisitet som den opprinnelige membranbundne reseptoren (10). Denne frie formen for immunglobulin (Ig) er det vi kaller antistoffer.

Antistoffer har flere funksjoner i bekjempelse av patogener. De kan fremme fagocyttering (opsonisering) i det medfødte immunforsvaret ved å feste seg til antigen på overflaten av mikroorganismer. Fagocytterne har reseptorer for den konstante (uspesifikke) Fc-delen av antistoffene og ”oppdager” derfor lettere mikroorganismer som er tilkoplede antistoff.

Antistoffer kan også nøytralisere virus og toksiner ved å binde seg til dem og derved hindre

at de angriper kroppens celler. Ettersom antistoffer har to bindeseter for antigener kan de i tillegg danne immunkomplekser av antistoff og frie antigen som fagocyteres lettere enn frie antigener alene.

Basert på strukturelle forskjeller finnes det fem forskjellige typer immunglobulin: IgA, IgG, IgD, IgE og IgM. IgM er som oftest membranbundet og er dominerende hos ikke-aktiverede celler. Av frie antistoffer er det IgG og IgA som er i overskudd.

IgG er det dominerende antistoffet i serum. Det er det mest effektive antistoffet til opsonisering og det som i størst grad diffunderer over i vev fra blod og lymfe (10). I en sekundær immunrespons er det hovedsaklig IgG som produseres.

IgA finnes som både monomer og dimer. Monomeren sekreses fra plasmaceller i lymfeknuter, milten og benmargen og finnes i blod og lymfe. Dimeren sekreses fra lymfevev som ligger under mucosaoverflater. IgA-dimeren transporteres fra lymfevevet til mucosaoverflaten via en reseptor kalt poly-Ig-reseptor (pIgR). Sekretorisk IgA (sIgA) som det nå kalles, har på veien fått et protein (sekretorisk komponent) som beskytter dimeren mot syre og diverse enzymer. Antistoffer i mucosa forhindrer dermed patogener fra å feste seg til og trenge inn i slimhinneepitelet. På denne måten samarbeider den humorale del av det adaptive immunforsvaret og den passive del av det medfødte immunforsvaret i kampen mot infeksjon. sIgA finnes foruten i mucosa i tårevæske, spytt, morsmelk og tårer.

Etter aktivering av T-celler og B-celler skjer det en spesifisering av reseptorene slik at de får en optimal tilpasning til sitt antigen. Dette kalles affinitetsmodning og innebærer for B-celler blant annet et skifte fra IgM-reseptorer til andre immunglobulintyper. I tillegg til effektorceller vil det dannes hukommelsesceller (både B- og T-celler) som blir igjen i kroppen etter at antigenet er eliminert. Disse cellene vil ha en høy affinitet til det antigenet som forårsaket infeksjonen. Hos B-celler er antistoffene da stort sett av IgG type (10). Ved en ny infeksjon med samme patogen (sekundærinfeksjon) vil man derfor få en raskere og mer effektiv respons enn første gang. Det er dette man ønsker å oppnå ved vaksinerings.

## 2.3. Vaksiner

Ved å tilføre kroppen antigener i form av en vaksine, vil immunforsvaret aktiveres, og hukommelsesceller vil bli dannet. Som nevnt over vil man da få en rask sekundær respons mot antigenet ved senere infeksjon. Antistoff beskytter kroppen ved å nøytralisere patogener på et tidlig stadium og derved hindre dem i å infisere kroppen, mens T-celler i samarbeid med antistoffer bekjemper infeksjonen.

Det finnes flere typer vaksiner, både mot bakterier og virus. Noen vaksiner er basert på hele mikroorganismen, mens andre kun består av deler av organismen. I hel-organisme vaksiner kan mikroorganismen enten være levende, men svekket (attenuert) eller drept (inaktivert). Levende organismer til vaksine er blitt dyrket i ikke-humant vev og mutert slik at de ikke lenger er patogene for mennesker (10). De vil imidlertid virke som antigen for den opprinnelige mikroorganismen og kan derfor brukes til immunisering. Oral poliovaksine er et eksempel på denne typen vaksine. Levende attenuerte vaksiner kan replikere til en viss grad og er derfor mer effektive enn inaktiverte vaksiner. Imidlertid er det et problem med tilbakemutering til den patogene formen av mikroorganismen, slik at sykdom kan oppstå av vaksinen. I tillegg kan den svekkede mikroorganismen skape sykdom hos mennesker med dårlig immunforsvar. Disse menneskene kan også bli smittet av friske personer som er vaksinert (3).

Den andre typen hel-organisme vaksine består av mikroorganismer som er inaktivert enten med varme eller kjemikalier, for eksempel formalin. Disse mikroorganismene kan ikke lenger replikere og er derfor ufarlige som patogener, men av samme grunn trengs det ofte flere boostere av vaksinen for å oppnå immunologisk hukommelse.

### 2.3.1. Influensavaksine

Influensavaksine består av influensavirus dyrket på befruktede hønseeegg og inaktivert med formalin (2). For at vaksinen skal være mest mulig effektiv må den inneholde de mest aktuelle varianter av de tre influensavirus som stadig sirkulerer, to influenza A-virus,

A(H3N2) og A(H1N1), samt et influensa B-virus (7,11). Hver vår sender WHO ut en anbefaling over hvilke influensavirus som bør tas med i høstens vaksine, da influensavirus gjerne forandrer seg litt fra sesong til sesong. Dette er basert på observasjoner av influensautbrudd på den sørlige halvkule i sommerhalvåret, da sykdommen som oftest oppstår der før den kommer til oss (4). Denne vaksinen gis som injeksjon, én dose før hver influensasessong (2), men det er nylig registrert en levende nasal vaksine mot influensa i USA. Det er usikkert om denne vil komme på markedet i Norge.

### 2.3.2. Slimhinnevaksine

Som tidligere nevnt er slimhinnene en del av den fysiske barrieren mot infeksjon, men det er likevel her de fleste patogener kommer inn i kroppen. Ved å administrere vaksiner direkte på slimhinnene etterligner man patogenets naturlige infeksjonsrute, og man vil få en lokal immunrespons i slimhinnene med produksjon av sekretorisk IgA. I tillegg er det vist at intranasal vaksinerings også gir systemisk respons (12).

Ved Folkehelseinstituttet er det gjort forsøk med forskjellige typer slimhinnevaksiner, både intranasal, peroral, gastrisk og rektal administrering. Det viste seg imidlertid at intranasal vaksinerings ga høyest induksjon av både IgG og IgA i serum samt IgA i saliva (13).

En av fordelene med intranasal vaksinerings i forhold til injeksjonsvaksiner er at det er mye enklere å administrere. Man slipper da i tillegg autorisert personale til å sette injeksjoner, og dette vil spare penger. Ved å benytte vaksiner formulert som nesespray/dråper, vil vaksinerings av store befolkningsgrupper bli både enklere og billigere, foruten mer behagelig for pasienten.

### 2.3.3. Adjuvans

For å øke immunresponsen mot en vaksine, brukes ofte en adjuvans, et ord som betyr ”hjelper”. Forskjellige adjuvantser virker på forskjellige måter, blant annet ved å forsinke utskillelsen av antigener fra vaksinen, øke opptak av antigener i makrofager og generelt

forsterke den inflammatoriske responsen, noe som leder til sterkere immunrespons også fra det spesifikke immunforsvaret (10). En slik adjuvans er blant annet betaglukan.

## 2.4. Betaglukan

Glukaner er polysakkarider som finnes naturlig i planter, sopp og bakterier. For over 50 år siden ble det i USA oppdaget at bakegjær som var oppløst og splittet av enzymer, inneholdt et stoff som interagerer med serumkomponenter involvert i destruksjon av mikroorganismer. Et par år senere ble det vist at komponenter i celleveggen til bakegjær hadde en stimulerende effekt på makrofager. Denne aktive komponenten var  $\beta$ -1,3/1,6-glukan (14). Soppekstrakter har fra gammelt av blitt brukt i tradisjonell orientalsk medisin blant annet mot kreft, og som generelt styrkende medisin. Nyere forskning bekrefter at betaglukaner fra sopp har antitumoreffekt og også sårhelende egenskaper (14,15).

Betaglukan har nå i mer enn ti år blitt brukt som sykdomsforebyggende middel til husdyr og oppdrettsfisk, mest som fôrtilsetning, men også som adjuvans i vaksiner (14). Resultater viser tydelig at betaglukan fører til økt sykdomsresistens og større vektøkning (15,16,17). En forgrening i 6-posisjon i beta-1,3-glukankjeden er en forutsetning for effektiv makrofagaktivering og biologisk virkning (15).

I denne oppgaven er det brukt beta-1,3/1,6-glukan (MacroGard®) i partikulær form fra Biotec ASA. Partikulært betaglukan er godkjent i USA av FDA, i kategorien Generally Regarded As Safe, og brukes som kosttilskudd til mennesker. Betaglukan i partikulær form blir ikke tatt opp fra tarmen i påviselige mengder, men det gir likevel systemisk effekt på dyr når det blir gitt peroralt. Dette kan være fordi stoffet reagerer med reseptorer på utløpere på makrofager og dendrittceller i underliggende lymfoid vev (15).

Størrelsen på partiklene er av stor betydning, da små partikler ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ) er mer effektive til å aktivere immunsystemet (18). MacroGard fra Biotec ASA har en partikkelstørrelse på 1-3  $\mu\text{m}$  og eksponerer et stort antall frie glukose-ender som kan binde til reseptorer på makrofager og dendrittceller (14).

I begynnelsen av en infeksjon er det uspesifikke (medfødte) immunforsvaret særdeles viktig. Fagocytter, NK-celler og serumkomponenter kan enten stoppe utviklingen av infeksjonen, eller via diverse cytokiner aktivere det spesifikke (adaptive) immunforsvaret. Aktivisering av det uspesifikke immunforsvaret kan skje gjennom påvirkning fra andre immunceller, eller direkte av bakterie- og soppprodukter. Betaglukan har spesifikke reseptorer på makrofager, dendrittceller, NK-celler og granulocytter, såkalte "Toll-like reseptorer" (14). En teori er at betaglukan derved skaper et aktivt uspesifikt immunforsvar, som er raskere til å reagere dersom en eventuell infeksjon skulle finne sted. Betaglukan er mer egnet til dette bruk enn andre sopp- og bakteriekomponenter som for eksempel LPS (lipopolysakkarider), som kan gi en toksisk reaksjon (15).

## **2.5. Hensiktene med forsøket**

Ved infeksjonssykdommer som influensa er det vist at de alvorligste symptomene kan skyldes ens eget immunforsvar. Immunresponsen kan altså bli for sterk, og i stedet for å bekjempe infeksjonen skapes det betennelse blant annet i lungene. Forsøk med medisiner som hemmer T-celleoppbygning i lungene bekrefter dette (19).

Ved Folkehelseinstituttet har det blitt påvist en modulerende effekt på immunresponsen (både cellulær og humoral) av betaglukan gitt som adjuvans til intranasal ikke-levende influensavaksine (Bjørn Haneberg, personlig meddelelse). I tillegg vet man at betaglukan gitt som kosttilskudd har ført til høyere vekt og økt overlevelse hos dyr. Om dette skyldes en bedre motstand mot infeksjon er ennå usikkert. Med bakgrunn i disse to påviste effektene av betaglukan kan det være naturlig å undersøke om en nedsatt immunrespons også har en negativ effekt på motstand mot sykdom, eller om motstanden mot sykdom ikke påvirkes.

For å belyse effektene av betaglukan har vi utført et forsøk med mus der betaglukan i partikulær form (MacroGard®, Biotec ASA, Norge) ble gitt intranasalt eller peroralt i ulike kombinasjoner med intranasal eller subcutan influensavaksine. Musene ble deretter smittet med influensavirus. Vi undersøkte hvorvidt betaglukan kunne påvirke immunresponsen



(dannelse av IgG og IgA) etter vaksinerings, og studerte også mulige effekter av betaglukan på grad av smitte (mengde virus i nesen) og tegn på sykdomsutvikling (kroppstemperatur og kroppsvekt). Hovedhensikten med forsøket var å studere eventuelle effekter av betaglukan, men forsøksoppsettet gjorde det også mulig å vurdere bruken av ulike kriterier for grad av klinisk sykdom. Hensiktene med forsøket kan oppsummeres som følger:

- Vurdere kriterier for klinisk sykdom og beskyttelse mot sykdom
- Vurdere effekten av intranasal versus subcutan vaksine
- Vurdere effekten av MacroGard på immunrespons etter vaksinerings, og beskyttelse mot sykdom etter smitte
- Undersøke om en lav antistoffrespons har innvirkning på beskyttelse mot sykdom

### 3. MATERIALER OG METODER

#### 3.1. Kort oversikt over forsøket

Det var ønskelig å bruke færrest mulig mus til forsøket av etiske grunner. For å kunne benytte ikke-parametriske statistiske metoder til analyse av resultatene, var det nødvendig med minst fem mus i hver gruppe. Med tanke på frafall i gruppene, ble det bestemt å ha seks mus i hver gruppe. Forsøket krevde ni ulike grupper for å kunne kontrollere alle nødvendige parametere. Totalt måtte vi derfor bruke  $6 \text{ mus} \times 9 = 54 \text{ mus}$ . Musene ble tilfeldig plassert i de forskjellige gruppene av personalet på dyrestallen.

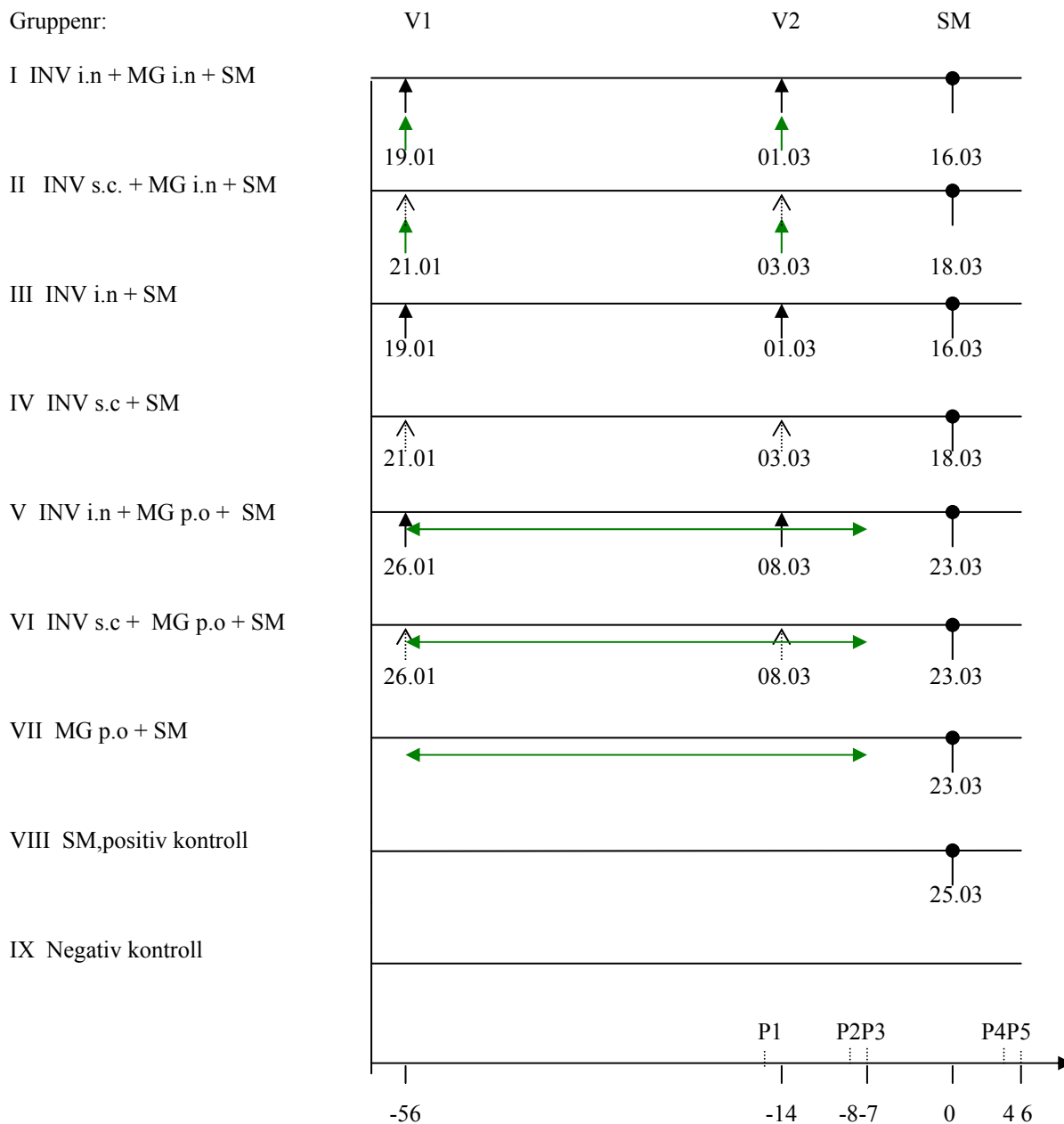
MacroGard ble gitt til musene i partikulær form. Vi ønsket å se på MacroGard som adjuvans i både intranasale og subcutane vaksiner, samt som kosttilskudd i kombinasjon med og uten vaksiner. Det ble derfor satt opp følgende grupper:

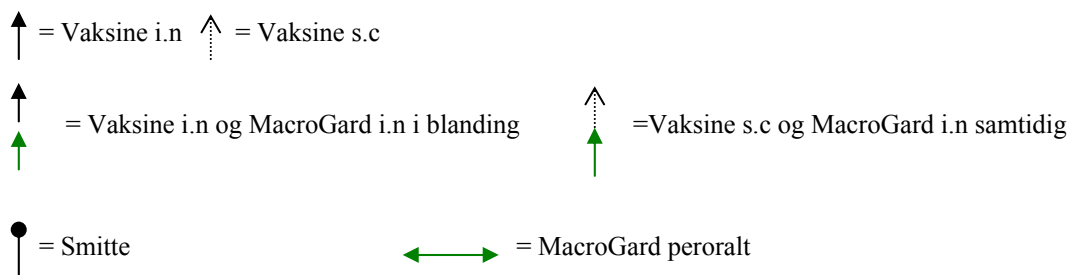
- Gruppe I: intranasal vaksine og MacroGard i blanding, smittes
- Gruppe II: subcutan vaksine og MacroGard intranasalt, smittes
- Gruppe III: kun intranasal vaksine, smittes
- Gruppe IV: kun subcutan vaksine, smittes
- Gruppe V: intranasal vaksine og MacroGard peroralt i 7 uker, smittes
- Gruppe VI: subcutan vaksine og MacroGard peroralt i 7 uker, smittes
- Gruppe VII: kun MacroGard peroralt i 7 uker, smittes
- Gruppe VIII: kun smitte
- Gruppe IX: ingen behandling eller smitte

I løpet av forsøket døde tre mus, én i hver av gruppene II, III og V. Musene døde før vaksinerings og utenom prosedyrer som kunne være plagsomme for musene.

Parallelt med mitt forsøk utførte Nina Løvrak et identisk forsøk med unntak i at hun brukte løselig MacroGard.

Nedenstående figur gir en grafisk fremstilling av forsøksforløpet. De horisontale linjene angir forløpet for hver av de ni gruppene (I – IX) med angivelse av dato for første og andre vaksinerings (V1, V2), dato for smitte (SM) og tidsangivelse for prøvetaking (P1 – P5). Den nederste linjen angir tidsforløpet i dager, der dag 0 er dato for smitte. Vaksiner ble gitt to ganger for å få en boostereffekt, med seks uker mellom vaksineringsene. Første vaksine ble følgelig gitt på dag –56. Dyrene ble smittet to uker etter siste vaksinerings. Peroralt MacroGard ble gitt fem dager i uken i 7 uker.





V1 = Første vaksinerings

V2 = Andre vaksinerings

INV = Inaktivert influensavirus, type PR8 (vaksine)

MG = MacroGard

i.n = intranasalt

s.c = subkutan

p.o = peroralt

SM = smitte med influensavirus, type PR8

P = prøvetaking

Prøver:

P1: vekt

P2: blodprøver

P3: salivaprøver, vekt og temperatur

P4: neseskyl, vekt og temperatur

P5: neseskyl, vekt og temperatur

For å kunne bedømme om musene var blitt syke, ble det målt vekt og temperatur, både før smitte samt fire og seks dager etter smitte. For å se om det var virus i nesen, også et tegn på smitte, ble det tatt neseskylprøver. Til analyse av mengde antistoff dannet av vaksinerings i blod og spytt, ble det tatt blod- og salivaprøver før smitte.

## **3.2. Forsøksdyrene**

### **3.2.1. Dyremodell**

Mus er en mye brukt infeksjonsmodell i forsøk med influensa, da de er små, billige og lette å håndtere. I tillegg er modellen ment å være forutsigbar og resultatene reproducerbare og sensitive.

Til smitte av mus må det brukes influensavirus som er spesielt adaptert til mus, da vanlig influensavirus ikke gir sykdom hos mus. 2-3 dager etter smitte vil symptomer på sykdom kunne observeres som nedsatt aktivitet og inntak av mat og drikke, økt respirasjon, vekttap, sammenkrøpet stilling og pjuskete pels. Av andre registrerbare sykdomstegn kan nevnes hypotermi og virusreplikasjon i lungene (20).

### **3.2.2. Generelt om musene**

Våre forsøksdyr var hvite mus av typen BALB/cABomTac. De kom til Folkehelseinstituttet 3. desember 2003 og var da 4 uker gamle. Ved første vaksinerings var de derfor rundt 9 uker gamle. Det var til sammen 108 mus, 54 til hver student. Som forklart over, ble de 54 musene delt inn i 9 grupper à 6 mus. Hver gruppe bodde sammen i ett bur på dyrestallen. Burene stod i et eget rom i et skap som holdt 20°C. Etter smitte ble burene flyttet over i et annet skap for å hindre smitte av de andre gruppene. I burene var det treflis som strø, og miljøet var beriket med tørkepapir. Alltid tilgjengelig var springvann på flaske og fôr i form av pellets i en kurv over buret samt noen nede i buret.

### **3.2.3. Fargemerking**

For å kunne skille musene i et bur fra et annet, ble musene farget i ulike fargekoder, én kode per bur. Dette ble gjort før forsøket startet. Som farge ble det brukt 1% pikrinsyre løst i vann. Dette ga en sterk gul farge. Musene ble farget ved at man dryppet et par dråper farge

på pelsen med en engangspipette og gned det godt inn med fingrene. Det er viktig at fargen kommer helt inn på de innerste hårene slik at ikke fargen forsvinner etter hvert.

De ulike gruppene ble farget som følger:

- Gruppe I: venstre skulder
- Gruppe II: høyre skulder
- Gruppe III: venstre hofte
- Gruppe IV: høyre hofte
- Gruppe V: i nakken
- Gruppe VI: ved haleroten
- Gruppe VII: ingen farge
- Gruppe VIII: begge skuldre
- Gruppe IX: begge hofter

#### 3.2.4. Øremerking

For å skille musene innad i gruppene, ble musene merket med hver sin hullkode i ørene. Dette ble gjort av personale på dyrestallen før forsøket startet. Ved hjelp av en tang ble det klippet hull i musenes ører.

Musene ble merket som følger:

- Mus 1: oppe i venstre øre
- Mus 2: nede i venstre øre
- Mus 3: oppe i høyre øre
- Mus 4: nede i høyre øre
- Mus 5: oppe i begge ører
- Mus 6: nede i begge ører

### 3.3. Forberedelse av vaksineløsningen

#### 3.3.1. Inaktivering av virus

Influensavaksinen skulle bestå av PR8 virus inaktivert med formalin. For å lage vaksineløsningen brukte vi følgende reagenser og utstyr:

Reagenser: PR8 virus  
Formalin 3,5%

Utstyr: Pipetter, spisser  
Målepipette  
Ristemaskin, Labinco L46  
Sterilt reagensrør med lokk

Alt arbeid med virus ble utført aseptisk i LAF-benk med vertikal luftstrøm. Virus ble samlet fra mange små rør som hadde vært frosset ned ved  $-70^{\circ}\text{C}$ . Rørene ble ristet på ristemaskin før de ble overført til et større rør med en pipette. Med en målepipette ble den samlede løsningen målt til 3,8 ml. Det ble deretter tilsatt formalin i oppmålt mengde.

Beregninger: Vi ønsket en vaksineløsning med totalkonsentrasjon på 0,07% formalin på bakgrunn av tidligere forsøk ved Folkehelseinstituttet (24). Ettersom originalløsningen med formalin var på 3,5%, måtte vi tilsette  $(3800\ \mu\text{l} \times 0,07) / 3,5 = 76\ \mu\text{l}$  formalin

Resultat: 3800  $\mu\text{l}$  virusløsning og 76  $\mu\text{l}$  formalin gir oss en inaktivert influensavirusløsning (INV) til videre bruk.

### 3.3.2. Totalprotein i virus

For å kunne tilpasse mengde virusløsning til vaksinerings var det nødvendig å finne ut det totale proteininnholdet i løsningen. Totalproteininnholdet vil avspeile mengden virus i løsningen, og vi ønsket en virusmengde opp imot konsentrasjoner som tidligere er vist å gi effekt (24). Vi visste imidlertid at vår løsning inneholdt en del ekstra eggeproteiner som måtte tas med i beregning i totalproteininnholdet.

Det ble brukt et BCA (Bicinchonysyre) Protein Assay kit til å utføre målingen. Denne metoden baserer seg på reduksjon av  $\text{Cu}^{2+}$  til  $\text{Cu}^{+}$  av peptidbånd i proteiner i basisk miljø (reaksjon 1).  $\text{Cu}^{+}$  vil danne chelater med BCA molekyler, og vi får et lillafarget kompleks (reaksjon 2) som har en maksimal absorpsjon ved 562 nm.

1. Protein (peptidbindinger) +  $\text{Cu}^{2+}$  → tetradenat-  $\text{Cu}^{+}$  - kompleks (basisk miljø)
2.  $\text{Cu}^{+}$  + 2 BCA → BCA-  $\text{Cu}^{+}$  - kompleks (lilla farge)

Utstyr:	BCA Protein Assay kit:	BSA (bovin serum albumin)-standard 2,0 mg/ml BCA-reagens A (natriumkarbonat, natriumbikarbonat, bicinchonysyre og natriumtartrat i 0,2N natriumhydroksid) BCA-reagens B (4% kopparsulfat)
	Mikrobrønn-plater	
	Pipetter, spisser	
	Målepipette	
	Plastrør	
	Inkubator, 37°C	
	UV-måleapparat, titertek Multiskan® plus, 550 nm filter	

Reagenser:	Inaktivert virusløsning
	PR8 virus
	NaCl 0,9%



## OMV (Outer Membrane Vesicle)

Det ble laget en fortynningsrekke av BSA og NaCl, fra 25 µg/ml til 2000 µg/ml med totalt 8 ulike fortynninger.

Inaktivert virus ble forynnet med NaCl i forholdene 1:1 og 1:10. Med en pipette ble tre rader i platen fylt med ufortynnet virusløsning samt alle BSA- og virusfortynningene. Det ble også fylt tre brønner med henholdsvis NaCl og OMV. OMV er en kjent proteinkonsentrasjon som benyttes som kontroll. I hver brønn ble det så tilsatt 200 µl Working Reagent som ble laget av 50 deler BCA-reagens A og 1 del BCA-reagens B.

Platen ble satt på en platerister i 30 sekunder. Deretter ble den dekket til og satt i inkubator ved 37°C i 30 minutter. Så ble den avkjølt på benken til romtemperatur i ca 10 minutter. Platen ble til slutt satt i UV-måler og absorbansen ble målt ved 550 nm. Dette gav en standardkurve for BSA for måling av proteinkonsentrasjon. Vi fant at totalproteininnholdet i den ufortynnede inaktiverede virusløsningen (stamløsningen) var 3,9 µg/µl.

### 3.4. MacroGard

#### 3.4.1. Vasking av MacroGard

Vasking av partikulært MacroGard (MG) er nødvendig for å fjerne formalin som er brukt som konserveringsmiddel.

Reagenser: MacroGard® Immersion Grade 2,5% (w/w) suspensjon i vann, konservert med 0,2% formalin, Biotec, Norge  
Destillert vann

Utstyr: Pipetter, spisser  
Eppendorfrør  
Sentrifuge, Biofuge 28RS, Heraeus, Sepatech

Ristemaskin, Labinco L46

Ultralydbad, Bandelin, Sonorex, RK 102H

Vasking av MacroGard ble utført samme dag eller dagen før bruk. Det ble gjort ved at 1 ml formalinkonservert MacroGard ble overført til et eppendorfrør og sentrifugert ved 3000 rpm i 10 minutter. Supernatanten ble sugd av og målt, og lik mengde destillert vann ble tilsatt MacroGard. Dette ble blandet godt på ristemaskin. Sentrifugeringen ble gjentatt, supernatanten sugd av igjen og erstattet med vann. Dette ble blandet på ristemaskin og tilslutt satt 1 minutt på ultralydbad.

### **3.5. Tillaging av vaksiner og MacroGard**

#### **3.5.1. Vaksiner**

Vaksiner ble laget samme dag som de skulle brukes. Dette ble gjort aseptisk i LAF-benk. INV-stamløsningen ble først satt 1 minutt på ultralydbad for å løse opp aggregater og finfordele partiklene. Løsningen ble deretter ristet på ristemaskinen før den ble pipettert ut og fortynnet til riktig konsentrasjon med PBS eller NaCl. Mengden stamløsning i  $\mu\text{g}$  som skulle brukes ble regnet ut fra mengden totalprotein i løsningen som var på  $3,9 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Vaksinedosene ble bestemt på bakgrunn av tidligere forsøk,  $50 \mu\text{g}/30 \mu\text{l}$  for intranasale vaksiner og  $5 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  for subcutane vaksiner (21,22). Mengde MacroGard var basert på doseringer av partikulært MacroGard som kosttilskudd til mennesker, som er  $10 \text{ mg/kg}$  (Bjørn Haneberg, personlig meddelelse). For en mus på 20g blir dette  $200 \mu\text{g}$  daglig.

Det ble laget 3 forskjellige typer vaksiner totalt:

- Intranasal vaksine i blanding med MacroGard til gruppe I ( $50 \mu\text{g}$  INV +  $200 \mu\text{g}$  MG/ $30 \mu\text{l}$ )
- Intranasal vaksine til gruppe III og V ( $50 \mu\text{g}$  INV/ $30 \mu\text{l}$ )
- Subcutan vaksine til gruppe II, IV og VI ( $5 \mu\text{g}$  INV/ $200 \mu\text{l}$ )

Reagenser: Stamløsning INV  
PBS (intranasale vaksiner) / NaCl 0,9% (subcutane vaksiner)  
MacroGard® Immersion Grade 2,5% (w/w) suspensjon i vann, konserveret med 0,2% formalin, Biotec, Norge

Utstyr: Pipetter, spisser  
Ristemaskin, Labinco L46  
Ultralydbad, Sonorex, RK 102H  
Sterilt reagensrør med lokk

Intranasal vaksine + MacroGard (Gr. I):

Til denne gruppen skulle det brukes INV stamløsning og MacroGard i blanding, med en viruskonsentrasjon tilvarende 50 µg og 200 µg MG i en 30 µl dose. Opprinnelig konsentrasjon i MacroGard-løsningen var 25 µg/µl.

Beregning: Mengde MacroGard per dose:  $200 \mu\text{g} / 25 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 8 \mu\text{l}$   
Mengde stamløsning per dose:  $50 \mu\text{g} / 3,9 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 12,8 \mu\text{l}$   
Med et overskudd på én dose trengte vi  $8 \mu\text{l} \times 7 = \underline{56 \mu\text{l MacroGard}}$   
 $12,8 \mu\text{l} \times 7 = 89,6 \mu\text{l INV}$ , og en totalløsning på  $30 \mu\text{l} \times 7 = \underline{210 \mu\text{l}}$ .  
 $210 \mu\text{l} - (56 \mu\text{l} + 89,6 \mu\text{l}) = \underline{64,4 \mu\text{l PBS}}$ .

Resultat: 89,6 µl INV stamløsning, 56 µl MacroGard og 64,4 µl PBS.

Intranasal vaksine (Gr.III og V):

Den intranasale vaksinen skulle ha en konsentrasjon på 50 µg/30 µl.

Beregning:  $50 \mu\text{g} / 3,9 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 12,8 \mu\text{l}$

For hver gruppe ble det regnet et overskudd på én dose, dvs. syv doser pr gruppe. Det trengtes derfor  $12,8 \mu\text{l} \times 7 = \underline{89,6 \mu\text{l stamløsning.}}$

Hver dose var på  $30 \mu\text{l}$ . Til sammen måtte vi ha  $30 \mu\text{l} \times 7 = \underline{210 \mu\text{l totalløsning.}}$

$210 \mu\text{l totalløsning} - 89,6 \mu\text{l stamløsning} = \underline{120,4 \mu\text{l PBS.}}$

Resultat:  $89,6 \mu\text{l stamløsning og } 120,4 \mu\text{l PBS.}$

*Subcutan vaksine (Gr. II, IV og VI):*

Til subcutan vaksine ønsket vi en konsentrasjon på  $5 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ .

Beregning:  $5 \mu\text{g} / 3,9 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 1,28 \mu\text{l}$

Da det er større sjanse for svinn ved subcutan vaksinerings beregnet vi her to doser i overskudd.  $1,28 \mu\text{l} \times 8 = \underline{10,2 \mu\text{l stamløsning.}}$

$200 \mu\text{l pr dose} \times 8 = \underline{1600 \mu\text{l totalløsning.}}$

$1600 \mu\text{l totalløsning} - 10,2 \mu\text{l stamløsning} = \underline{1589,8 \mu\text{l NaCl.}}$

Resultat:  $10,2 \mu\text{l stamløsning og } 1589,8 \mu\text{l NaCl}$

### 3.5.2. MacroGard

MacroGard ble også laget samme dag som det skulle brukes, aseptisk i LAF-benk. Det ble benyttet ferdigvasket MacroGard.

Reagenser: MacroGard

PBS (intranasalt)

Destillert vann (peroralt)

Utstyr:       Pipetter, spisser  
              Sterilt reagensrør med lokk

MacroGard til intranasal administrering (Gr. II):

Dosen skulle være på 200 µg i 30 µl. Opprinnelig konsentrasjon av MacroGard var 25 µg/µl.

Beregning:   200 µg / 25 µg/µl = 8 µl.  
              Med én dose i overskudd: 8 µl × 7 = 56 µl MacroGard.  
              30 µl dose × 7 = 210 µl totalløsning.  
              210 µl totalløsning – 56 µl MacroGard = 154 µl PBS.

Resultat:     56 µl MacroGard og 154 µl PBS.

MacroGard til peroral administrering (Gr. V, VI og VII):

Også her ble det bruktes en konsentrasjon på 200 µg/30 µl.  
Ferdigvasket MacroGard ble blandet med destillert vann i et plastrør.

Beregning:   200 µg / 25 µg/µl = 8 µl.  
              Vi skulle gi MacroGard peroralt til 3 grupper (18 mus) og beregnet 4 doser i  
              overskudd. 8 µl × 22 = 176 µl MacroGard.  
              30 µl × 22 = 660 µl totalløsning.  
              660 µl totalløsning – 176 µl MacroGard = 484 µl destillert vann.

Resultat:     176 µl MacroGard og 484 µl destillert vann.

### 3.6. Administrering av vaksiner og MacroGard

#### Intranasal vaksine:

Musene ble holdt i nakkeskinnet og øverst på halen med én hånd, slik at den ble liggende med ryggen inn mot håndflaten. Slik hadde man god kontroll på musen. 30µl vaksineløsning ble dryppet dråpevis med automatpipette på nesetippen til musen. Musen lå med hodet litt nedover for å hindre at vaksinen rant bort fra nesen. Det var viktig at musen fikk tid til å puste inn vaksinen slik at den fikk i seg hele dosen.

Samme metode ble brukt til å gi MacroGard intranasalt.

#### Subcutan vaksine:

Vaksineringen ble utført ved at musene stod på burløkket og holdt seg fast med forlabbene, mens de ble holdt etter halen. Musene fikk så injisert vaksine (200µl) under huden nederst på ryggen.

#### MacroGard peroralt:

Musene ble holdt i samme grep som ved intranasal vaksinering, men de ble holdt vertikalt. 30µl MacroGard-løsning ble gitt ved hjelp av en pipette i munnen til musen.

### 3.7. Smitte

En virusløsning med konsentrasjon 1: 10 000 ble brukt til å smitte musene. Dette var basert på tidligere forsøk ved Folkehelseinstituttet (21,22). Under smitte var dyrene anestesert med Diprivan 10mg/ml. Tidligere forsøk (23) har vist at betydelig større mengder antigen blir inhalert under anestesi enn uten. Dessuten er det lettere å standardisere hvor mye virusløsning hver mus får ettersom musene ligger helt rolig under smitte. I tillegg blir det lettere å sammenligne med tidligere forsøk gjort på Folkehelseinstituttet (21,22,24), da det også der har blitt brukt anestesi under smitte.

### 3.7.1. Tillaging av smitteløsning:

Reagenser: PR8-influenzavirus  
BSA  
PBS

Utstyr: Analysevekt, Mettler, AE 240  
Plastrør  
Ristemaskin, Labinco L46  
Pipetter og spisser  
Erlenmeyerkolbe  
Røremaskin  
Liten målekolbe (10ml)

0,4 g BSA ble veid og løst i 19,6 ml PBS i en erlenmeyerkolbe og satt til røring i 1 time.

5µl virusløsning ble pipettert ut og fortynnet med 495 µl 2% BSA i PBS i et plastrør.

Blandingen ble ristet på ristemaskin. 10 µl av den fortynnede virusløsningen ble overført til et nytt rør der den ble ytterligere fortynnet med 990 µl 2% BSA i PBS og ristet på ristemaskin.

### 3.7.2. Smitte av musene

Reagenser: Diprivan 10 mg/ml  
PR8 virusløsning

Utstyr: Varmelampe  
Fengslingsstativ  
Sprøyter, 1ml  
Kanyler, 16 mm×0,5  
Automatpipette  
Pipettespisser

Museburet ble først satt under en varmelampe for å gjøre blodårene mer synlige på musene. Deretter ble en og en mus tatt ut og satt i fengslingsstativet for holde dem rolige og gjøre halen tilgjengelig. Dyrepersonell injiserte Diprivan (0,05 ml) intravenøst i halen til musene. Musene ble deretter lagt på rygg og holdt på samme måte som ved intranasal vaksinerings mens 20 µl virusløsning ble dryppet på nesetippen deres.

### **3.8. Innsamling av prøvemateriale og preparering av prøver**

#### **3.8.1. Veiing**

Utstyr:           Vekt, Satorius BL 600  
                  Kanylebøtte

En og en mus ble tatt opp fra buret og plassert i en tarert kanylebøtte på vekten. Musens identitet og vekt ble notert.

#### **3.8.2. Temperaturmåling**

Utstyr:           Mikrochips, IPTT-200, 2,2 × 14 mm, temperatursensor 0,1°C  
                  Skanner, DAS-5002 Notebook

##### Innsetting av ”chips”:

For å lette temperaturmålingen ble det benyttet mikrochips som skulle settes under huden på ryggen på musen og gjøre det mulig å lese av musen identitet og temperatur med en skanner. Chipsene var omtrent halvannen cm lange og litt over to mm i diameter. En og en chip ble programmert inn i avlesningsmaskinen med bur- og musenummer. Deretter ble riktig chip satt inn subcutant i riktig mus med en spiss sonde. Denne prosedyren ble utført av dyrepersonell.



#### Avlesing av temperatur:

En og en mus ble tatt ut av buret og skannet. Musens identitet og temperatur kunne leses av og noteres.

### 3.8.4. Saliva

#### Samling av salivaprøver:

Reagenser: Pilokarpin 1 mg/ml

Utstyr: Plastbelagt benkepapir  
Petriskåler (9 cm)  
Metallgitter (~11×11 cm)  
Plastbokser med pustehull (klar plast, 350 ml)  
Eppendorfrør 1,5 ml tarerte med to veker i  
Veker, Polywicks (2 mm×25 mm) Polyfiltronics Group Inc., USA  
Pinsett  
Engangssprøyter 1ml  
Kanyler  
Isoporkasse med is  
Analysevekt, Mettler, AE 240

Musene ble satt på merkede plasser på benken, med en petriskål med metallgitter over for å samle opp saliva, og en plastboks over for å holde dem på plass. For å øke spyttproduksjonen fikk hver mus en injeksjon med 0,1 ml pilokarpin 1mg/ml intraperitonalt. Etter et par minutter begynte virkningen av pilokarpinen, og spytt fra munnen til musene samt dråper på petriskål, metallgitter og plastboks ble sugd opp ved hjelp av absorpsjonsveker. Etter oppsamling ble vekene lagt i merkede eppendorfrør og satt på is. Prøvene ble veid og deretter oppbevart ved -20°C til ekstrahering.

### Ekstrahering av salivaprøver:

Reagenser: 0,01M PBS med 0,05% Tween 20 (ekstraksjonsbuffer)

Utstyr: Pipette, spisser  
Reagensrør  
Kanyle  
Gassbrenner, Fireboy Plus, Intregra Bioscience  
Ristemaskin, Labinco L46  
Sentrifuge, Sorvall GLC-1  
Cryorør, merkede  
Isoporboks med is

Prøvene ble tatt opp fra -20°C og holdt på is. Hvert rør ble tilsatt 400 µl ekstraksjonsbuffer og to og to rør ble ristet kraftig på ristemaskin i minst ett minutt. Ved hjelp av en rødglødende kanyle ble det stukket hull i bunnen av eppendorfrørene før de ble plassert oppi hvert sitt reagensrør (oppsamlingsrør). Oppsamlingsrørene ble satt til sentrifugering ved 3000 rpm i 10 minutter. Prøvene rant dermed ned i oppsamlingsrøret, hvorfra de ble sugd opp og overført i merkede cryorør og lagt på is. Prøvene ble igjen oppbevart ved -20°C inntil videre analysering.

### 3.8.5. Neseskylling

Reagenser: 2% BSA i PBS

Utstyr: Petriskåler  
Sprøyter, 1 ml  
Plastrør  
Isoporboks med is

Musene ble holdt slik at de lå på rygg med hodet ned over en petriskål. 500 µl 2% BSA i PBS ble dryppet ned i leppespalten med en sprøyte, slik at det rant ned i nesen og ned på petriskålen. Dette var enklest om én person holdt og en annen skylte. Væsken ble så sugd opp ved hjelp av en sprøyte og ned i et merket plastrør. Prøvene ble plassert på is, før de ble frosset ned ved -70°C.

### 3.8.3. Blod

#### Veneprøver:

Utstyr: Kapillarrør  
Kapillarrør-pumpe  
Eppendorfrør med microtubes inni  
Skalpell  
Kanyler  
Varmelampe

Burene ble først plassert under en varmelampe for å gjøre det enklere å få tatt blodprøver av musene. Prøvetakingen ble utført av dyrepersonell. Musene ble puttet inn i et plastrør med hull på leggvenen med en kanyle. Blodet ble så samlet opp i kapillarrør og overført til microtubes i eppendorfrør. Det ble tatt to kapillarrør for hver mus.

#### ”Tomtapping” og avlivning:

Utstyr: Sprøyter, 2 ml  
Kanyler, 40 mm  
Eppendorfrør  
Saks og pinsett

Tomtappingen ble utført av dyrepersonell. Musene ble bedøvet med CO<sub>2</sub> gass, 3 mus om gangen i en kanylebøtte. Pelsen på brystet ble klippet opp, og en sprøyte ble stukket inn i hjertet. Blodet ble sugd ut mens hjertet slo. Blodet ble så overført til merkede eppendorfrør.

#### Preparering av blodprøver:

Utstyr:           Sentrifuge, Biofuge 28RS, Heraeus, Sepatech  
                  Pipette, Gilson  
                  Plastrør

Blodprøver og blod fra tomtapping stod først 1,5 time i romtemperatur, deretter en time i kjøleskap før de ble sentrifugert ved 3000 rpm i 10 minutter. Serumet ble sugd av og overført til merkede plastrør. Prøvene ble oppbevart ved -20°C inntil analysering.

## 3.9. Analyse av prøvemateriale

### 3.9.1.ELISA

ELISA er en av de mest brukte serologiske testene til å detektere antigen eller antistoff. Testen baserer seg på at merkede enzymer lenkes til antigener eller antistoffer. Ved tilsetning av et fargeløst substrat som reagerer med enzymet (et kromogen) og produserer farge, kan mengden antigen eller antistoff bestemmes ved måling av UV absorpsjon (3). Det finnes to versjoner av ELISA, dobbel sandwich antistoff metoden som brukes til å detektere antigen, og den indirekte metoden som i stedet detekterer antistoff. Da vi ønsket å bestemme mengde antistoff i våre prøver, brukte vi den indirekte ELISA-metoden. Til ELISA benyttes en plate med mikrobørner i 12 rader og 8 kolonner. I den indirekte ELISA-metoden dekkes først brønnene med antigen før testløsningen (serum/saliva) tilsettes (Figur 3.9.1.A, (25)). Eventuelle antistoffer vil da bindes til antigen. Deretter tilsettes et enzymkonjugert anti-antistoff som vil bindes til test-antistoff. Til slutt tilsettes substrat for fargereaksjon.



**Figur 3.9.1.A: ELISA brønner, venstre til høyre:**

1. antigen
2. antigen + antistoff
3. antigen + antistoff + enzymkonjugert anti-antistoff
4. antigen + antistoff + enzymkonjugert anti-antistoff + substrat, farge produseres av reaksjonen

Utstyr: Nunc-Immuno plate F96, Cert Maxisorb  
Pipetter  
Gaffelpipette  
Ristemaskin, Labinco L46  
Magnetrorer

Plastfolie

Aluminiumsfolie

Cellestoff

UV-maskin, titertek Multiscan® Plus, filter 492nm

Reagenser: Se Vedlegg

#### *”Coating”:*

For at antistoff skulle bindes til ELISA platene, måtte de ”coates” med antigen. For å oppnå spesifisitet mot ønskede antistoffer ble det brukt samme antigen som til vaksinerings og smitte. Det ble tilsatt 100 µl 10,8 µg/ml INV-løsning i hver brønn, unntatt i kolonne 12. Her ble det kun satt PBS for å kunne kontrollere at antistoff ble bundet til antigen og ikke til selve brønnen. Etter coating ble platene pakket inn i plastfolie og aluminiumsfolie og satt i kjøleskap i minst 24 timer.

#### *Vasking:*

For å fjerne antigen som ikke festet seg i brønnene, måtte platene vaskes. Først ble overskuddet av antigen helt av; man fylte så brønnene med vaskebuffer og lot dem stå i ca 30 sekunder før man igjen helte det av og gjentok prosessen. Mellom vaskingene ble platene dunket mot cellestoff for å fjerne rester av væske i brønnene. Platene ble vasket fire ganger.

#### *Blokkering:*

For å hindre uspesifikk binding av antistoff ble platene behandlet med blokkeringsbuffer. 200 µl buffer ble plassert i hver brønn, og platene ble satt i varmeskap ved 37°C i én time og avkjølt på benk. Deretter ble platene vasket fire ganger med vaskebuffer for å fjerne overskudd av blokkeringsbufferen.

#### *Prøvepåsetting:*

Det ble tilsatt 100 µl blokkeringsbuffer i hver brønn, med unntak av i rad 1, 11 og 12. I rad 1 skulle det være 200 µl av utgangskonsentrasjonen av prøven fortynnet med

blokkeringsbuffer. Fortynningen ble gjort direkte i brønnen ved at først 200 µl minus korrekt mengde prøve (serum eller saliva) ble satt i brønnen, hvorpå den korrekte mengden prøve ble tilsatt og blandet godt med pipetten. Deretter ble 100 µl fra rad 1 titrert bortover til kolonne 10 hvorefter de resterende 100 µl ble kastet. I rad 11 og 12 ble det tilsatt blokkeringsbuffer og prøve i riktig mengde (fortynnet i brønnen som for rad 1), til sammen 100 µl.

#### *Konjugat:*

Konjugatet var et enzymkonjugert antistoff som skulle binde seg til antistoffene vi ønsket å måle. Ved måling av IgA ble det brukt Sigma peroksydase-konjugert geit anti-mus-IgA og for IgG Sigma peroksydase-konjugert geit anti-mus-IgG. Konjugatet ble fortynnet 1:1000 i blokkeringsbuffer, og 100 µl satt i hver brønn. Platene fikk stå i nøyaktig en time på benken før de ble vasket seks ganger med vaskebuffer.

#### *Substrat:*

OPD (orto-fenyl-diamin) ble brukt som substrat. For hver plate ble en tablett OPD ble løst i 12,5 ml fosfat-citrat-buffer. Dette ble gjort i mørke, da tablettene er lyslabile. 5 µl  $\text{H}_2\text{O}_2$  pr tablett ble tilsatt rett før løsningen skulle settes på platene. Dette virker som en katalysator for fargereaksjonen. 100 µl ble satt i hver brønn, og platene ble satt mørkt.

#### *Stoppløsning:*

Etter nøyaktig 30 minutter fra substratpåsettning ble 50 µl 1,25M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  tilsatt hver brønn. Dette stoppet fargereaksjonen.

#### *Avlesing:*

Etter påsetting av stoppløsning måtte platene stå i 10 minutter for at fargen skulle stabilisere seg før avlesing. I de brønnene der antistoff var til stede, hadde det etter påsetting av substrat utviklet seg en gul-orange farge. Intensiteten til denne fargen var proporsjonal med mengden antistoff i prøven, og det var denne fargeintensiteten som ble målt.

### *Beregning:*

På hver plate ble det satt en standard med kjent konsentrasjon. Standarden ble titrert bortover platen på lik linje med prøvene. Optical Density (OD) -verdiene til standardløsningen ble brukt til å lage en standardkurve for platen. Antistoffkonsentrasjonen ble satt på x-aksen og OD-verdiene på y-aksen. Standardkurven var tilnærmet rettlinjet og ble brukt til å beregne konsentrasjonene til prøvene ut fra avlest OD-verdi.

### 3.9.2. Definerings av standard

Til dette bruk hadde vi to grupper à fem mus som ble vaksinert intranasalt med INV (58 µg totalproteinmengde i 30 µl dose). Musene ble vaksinert tre ganger. Det ble samlet saliva til måling av IgA, og serum fra tomtappingen til IgG. Til definering av standard for IgA ble den musen som viste høyest respons valgt ut. Ettersom musene ble vaksinert intranasalt, viste prøvene ikke god nok respons for IgG til at disse kunne brukes som standard. Det ble i stedet brukt serum fra tomtapping fra mus i gruppe IV.

#### IgG

Per definisjon har den brønnen med OD-verdi nærmest 0,2 en antistoffmengde på 1 U (26). I brønnen med fortynning 1:2560 hadde vi en OD-verdi på 0,268. Konsentrasjonen i denne brønnen var derfor 1 U/100 µl. Ved tilbakeregning fikk vi da utgangskonsentrasjonen av IgG-antistoffer:  $1 \text{ U}/100 \text{ µl} \times 2560 = 2560 \text{ U}/100 \text{ µl} = 25600 \text{ U/ml}$ . For enkelthets skyld definerte vi standarden til 25000 U/ml.

#### IgA

For musen med sterkest respons var det en OD-verdi på 0,268 i brønnen med fortynning 1:10. Antistoffmengden her var følgelig 1 U/100 µl, og utgangskonsentrasjonen ved tilbakeregning ble:  $1 \text{ U}/100 \text{ µl} \times 10 = 10 \text{ U}/100 \text{ µl} = \underline{100 \text{ U/ml}}$ .



### 3.9.3. Virus i neseskyllevæsken

Influenzaviruset har evnen til å agglutinere røde blodlegemer. Relativ mengde virus i de ulike prøvene kan bestemmes ved å lage en fortynningsrekke av influensavirus og deretter tilsette røde blodlegemer fra kalkun i en konstant mengde. Virustiteret er den inverse verdien av høyeste fortynning som viser full hemagglutinasjon.

Fordi neseskyllevæsken var svært fortynnet, ville det ikke være nok virus tilstede til å få en positiv hemagglutinasjon. For å øke den opprinnelige virusmengden ble viruset sådd ut på nyreceller fra hund (MDCK-celler). Viruset ville da infisere cellene og proliferere intracellulært. Man ville dermed ende opp med en større mengde virus som kunne brukes til forsøket.

Utstyr:           Pipetter, automat og manuell  
                  96 brønners mikrotiterplate m/lokk

Reagenser:     PBS WHO pH = 7,2  
                  0,25% kalkunblod i PBS med BSA  
                  Kontrollvirus: A/PR/8 (H1N1)  
                  Nyreceller fra hund (MDCK-celler)  
                  Marsvinblod

Prosedyren ble utført av personalet ved seksjon for virologi.

#### Forarbeid:

Neseskylleprøvene ble sådd ut på MDCK-celler tilsatt trypsin. Trypsin var tilsatt for at cellene skulle løsne fra hverandre.

For å avgjøre hvilke prøver som inneholdt virus, ble det undersøkt for cytopatogen effekt. Dette kunne observeres som huller i et ellers tett cellelag på innsiden av prøverørene. Som en kontroll på riktig avlesning ble både positive og negative prøver undersøkt videre.

#### Bestemmelse av virustiter:

Det ble tilsatt 50 µl PBS til hver av brønnene i en mikrotiterplate. Deretter ble 50 µl prøve tilsatt hver av brønnene i første rad og titrert bortover (1:2 fortynning) til og med nest siste rad. Den siste raden inneholdt ikke prøve og var en kontroll på de røde blodlegemene. Det ble så tilsatt 50 µl 0,25% kalkunblod i PBS med BSA til alle brønnene, og etter 30-45 minutter ble platene avlest. Virustiteret ble beregnet som den inverse verdien av den høyeste fortynningen som viste full agglutinasjon.

### **3.10. Statistiske metoder og grafisk presentasjon**

Til beregning av statistikk og utforming av grafisk presentasjon av resultatene ble programmet GraphPad Prism<sup>TM</sup> versjon 2.0 benyttet. For å sammenligne ulike grupper ble Mann-Whitney metoden brukt, og for å sammenligne resultater innen samme gruppe brukte vi Wilcoxon "signed rank" test. Begge disse testene er ikke-parametriske metoder, hvor det er rangering av verdier og ikke størrelsen av verdiene som er av betydning. P-verdier  $< 0,05$  ble regnet som signifikante.

## **4. RESULTATER**

### **4.1. Observasjon av musene**

Før smitte var musene aktive, blanke i pelsen og så ut til å være i godt hold. Ofte når vi hentet burene, lå de tett i grupper og sov eller hvilte. Det ble imidlertid liv med en gang et bur ble tatt ut av hyllen det stod i, og også i de andre burene ble det merkbart økning i aktivitet. Under håndtering var musene naturlig nok noe urolige, noe som viste seg i økt avføring og urinering. Men når de ble sluppet tilbake i buret, viste de ikke noen tegn på forstyrrelse, og oppførte seg som før de ble tatt opp av buret.

Etter smitte så vi at enkelte mus ble mer pjuskete i pelsen, ble tynnere og holdt seg mer for seg selv. Det var forskjeller innen gruppene, ikke alle mus viste like store tegn på sykdom. Imidlertid så vi stor forskjell mellom de gruppene som ikke var vaksinert og de som hadde fått vaksine, enten intranasal eller subcutan, de ikke-vaksinerte musene ble merkbart tynnere og mer pjuskete enn de vaksinerte.

### **4.2. Mål på klinisk sykdom**

Det var to målbare parametere for klinisk sykdom: vekttap og temperaturfall. Vi ønsket å se om disse parametrene var like pålitelige, og om det var samsvar mellom dem. Blant alle musene selekterte vi derfor to populasjoner der den ene populasjonen ble bedømt som syke basert på vekttap etter smitte, mens den andre populasjonen ble bedømt som syke basert på temperaturfall etter smitte. Som grenser for klinisk sykdom valgte vi et vekttap på mer enn to standardavvik (2 SD) fra gjennomsnittet av alle musene, eller et temperaturfall på mer enn én grad Celsius. Disse valgene var basert på en tidligere studie ved Folkehelseinstituttet (24). Det var 13 mus blant alle gruppene som oppfylte kriteriet for klinisk sykdom basert på vekttap  $> 2$  SD (Tabell 4.2). Dette tilsvarte et tap på mer enn 13,3% av gjennomsnittlig kroppsvekt etter smitte. Disse musene hadde medianverdier for vekttap på 17,3% og for temperaturfall på 3,2°C fra før til etter smitte. Til sammenligning besto den gruppen som

ble bedømt for sykdom etter temperaturfall av 26 mus, der medianen for temperaturnedgang lå på 2,2°C. Dette var en ikke signifikant forskjell fra den gruppen som ble bedømt etter vekttap. Imidlertid hadde gruppen som ble bedømt etter temperatur en median vektnedgang på kun 9,4%, noe som var signifikant lavere enn den første gruppen. Det var derfor ikke samsvar mellom de to måtene å bedømme sykdom på.

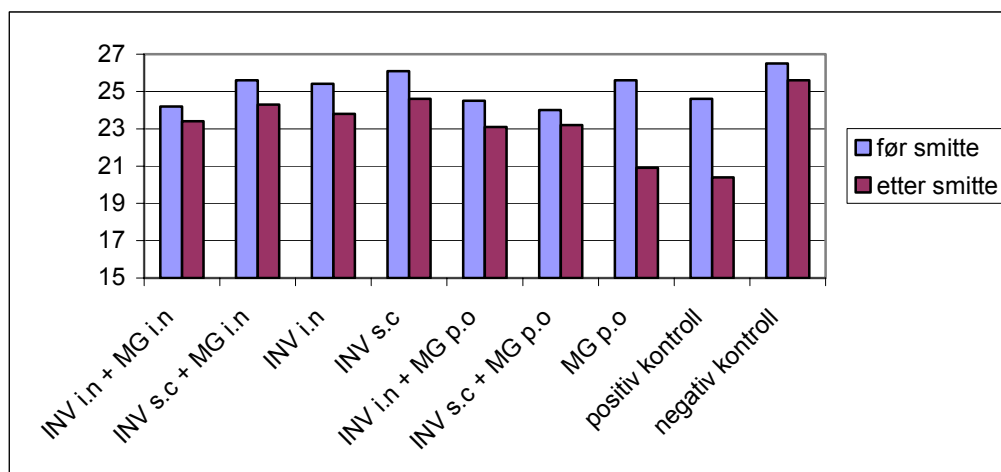
**Tabell 4.2: Sammenligning av grupper regnet som klinisk syke** etter kriterier basert på vekttap i % eller temperaturfall i °C fra før til etter smitte. Verdier er oppgitt som median med spredning i parentes. Forskjeller mellom gruppene er oppgitt som P-verdier. i.s. = ikke signifikant.

	Observert vekttap (%)	Observert temperaturfall (°C)
Mus med sykdom basert på vekttap > 13,3% n = 13	<b>17,3</b> (14,3-25,6)	<b>3,2</b> (0,5-5,5)
<i>P</i>	<i>0,007</i>	<i>i.s.</i>
Mus med sykdom basert på temperaturfall > 1°C n = 26	<b>9,4</b> (0-25,6)	<b>2,2</b> (1,0-5,5)

## 4.3. De registrerte måleparametere

### 4.3.1. Vektmålinger – alle grupper

Ved måling av vekt var det ved 6 uker før smitte en del ujevnheter i vekt mellom gruppene, noe som jevnet seg ut til målingen 1 uke før smitte, muligens fordi musene vokste i ujevnt tempo. Jeg valgte derfor å bruke målingene fra 1 uke før smitte som utgangspunkt i mine sammenligninger. Alle gruppene gikk ned i vekt fra før til etter smitte (Figur 4.3.1). Det var imidlertid stor forskjell i vekttapene mellom gruppen som kun ble smittet (positiv kontroll) og gruppen som ikke ble smittet (negativ kontroll). Den positive kontrollen hadde et signifikant vekttap ( $P = 0,03$ ), mens vekttapet hos den negative kontrollen ikke var signifikant. Gruppen som kun fikk MacroGard peroralt før smitte gikk omtrent like mye ned i vekt som den positive kontrollen, også her med en P-verdi på 0,03. De andre gruppene gikk ikke like mye ned i vekt, selv om vekttapene var signifikante for gruppen som fikk MacroGard intranasalt med intranasal vaksine ( $P = 0,03$ ) og for gruppen som kun fikk subcutan vaksine ( $P = 0,03$ ). Videre detaljer vedrørende vekttapene er omtalt i senere avsnitt.

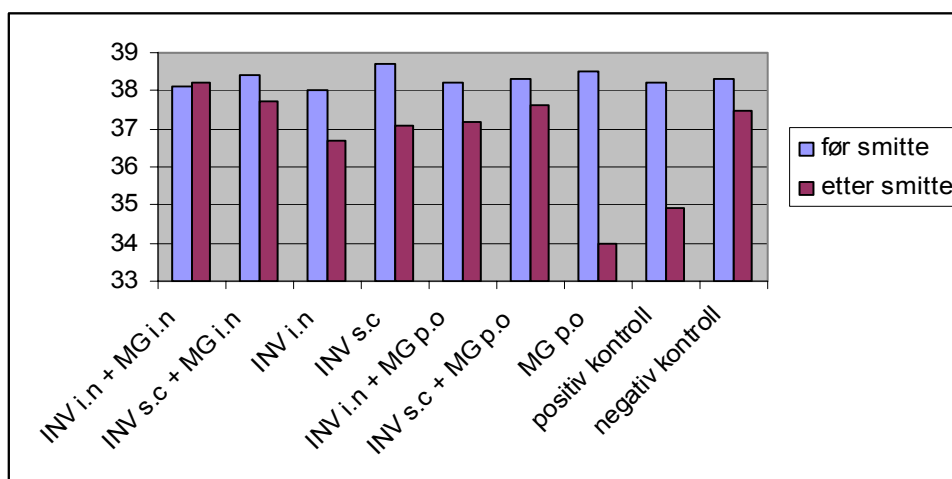


**Figur 4.3.1: Medianvekten i gram for de ulike gruppene 7 dager før smitte og 6 dager etter smittetidspunktet.** I.n: intranasal vaksine, MG I.n: MacroGard intranasalt, s.c: subcutan vaksine, MG p.o: MacroGard peroralt, positiv kontroll: kun smitte, negativ kontroll: verken vaksine eller smitte.

### 4.3.2. Temperaturmålinger – alle grupper

Til forskjell fra tidligere oppgaver er det i denne oppgaven brukt mikrochips til temperaturmåling. Stort sett gikk målingene greit, men det tok ofte tid å få scannet chipsene. Etter som chipsene lå i det subcutane rom, hadde de på enkelte mus flyttet seg rundt på kroppen eller kapslet seg inn i vev slik at musene ble stående lenge utenfor buret, noe som kunne ha vært stressende for musen. Der chipsene var vanskelige å finne måtte man av og til også lete rundt på musen med hendene etter chipsen.

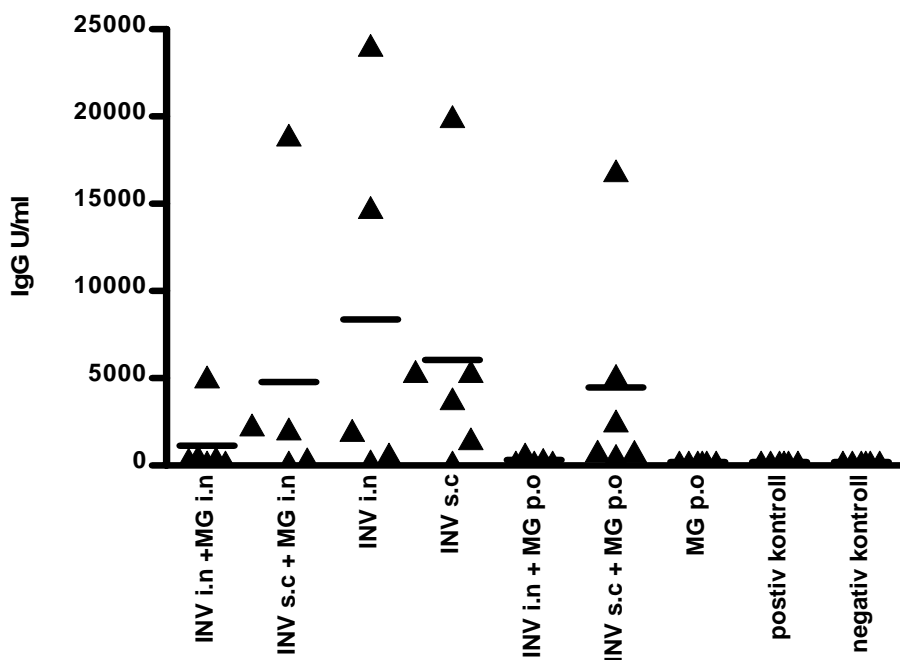
Stort sett sank temperaturen hos alle gruppene etter smitte (Figur 4.3.2). I gruppen som fikk MacroGard intranasalt i blanding med intranasal vaksine gikk medianen opp én grad etter smitte, men også i denne gruppen var det mus som gikk ned i temperatur. Det er tydelig at gruppene som ikke fikk vaksine (kun MacroGard peroralt og positiv kontroll) gikk betydelig mer ned i temperatur etter smitte enn de andre gruppene. Hos begge gruppene var temperaturfallet signifikant ( $P = 0,03$ ). Det var det imidlertid også for den negative kontrollen ( $P = 0,03$ ) og gruppen som kun fikk subcutan vaksine ( $P = 0,03$ ). Videre detaljer vedrørende temperatur er omtalt i senere avsnitt.



**Figur 4.3.2: Mediantemperaturen i °C for de ulike gruppene 7 dager før og 6 dager etter smittetidspunktet. For forklaringer på forkortelser, se figur 4.3.1.**

### 4.3.3. IgG i serum – alle grupper

Alle gruppene som ble vaksinert utviklet IgG-antistoffer i serum. For grupper som hadde fått subcutan vaksine, med eller uten MacroGard, lå medianverdiene ganske likt. For gruppene som hadde fått intranasal vaksine, var det en tydelig forskjell mellom gruppen som ikke hadde fått MacroGard og de andre to gruppene som hadde fått MacroGard henholdsvis intranasalt og peroralt. Gruppen som kun hadde fått intranasal vaksine, hadde en medianverdi for IgG som lå høyere enn for gruppene som var vaksinert subcutant, mens medianverdiene for gruppene som hadde fått MacroGard enten intranasalt eller peroralt var betydelig lavere (Figur 4.3.3). I grupper som ikke hadde fått vaksine var det ingen målbare verdier for IgG, det vil si <200 U/ml som var den nedre grensen for å registrere verdier av IgG. For å kunne sammenligne grupper med den positive kontrollen som ikke hadde målbare verdier, ble disse satt til 200 U/ml som en absoluttverdi. Videre detaljer vedrørende IgG-verdier er omtalt i senere avsnitt.

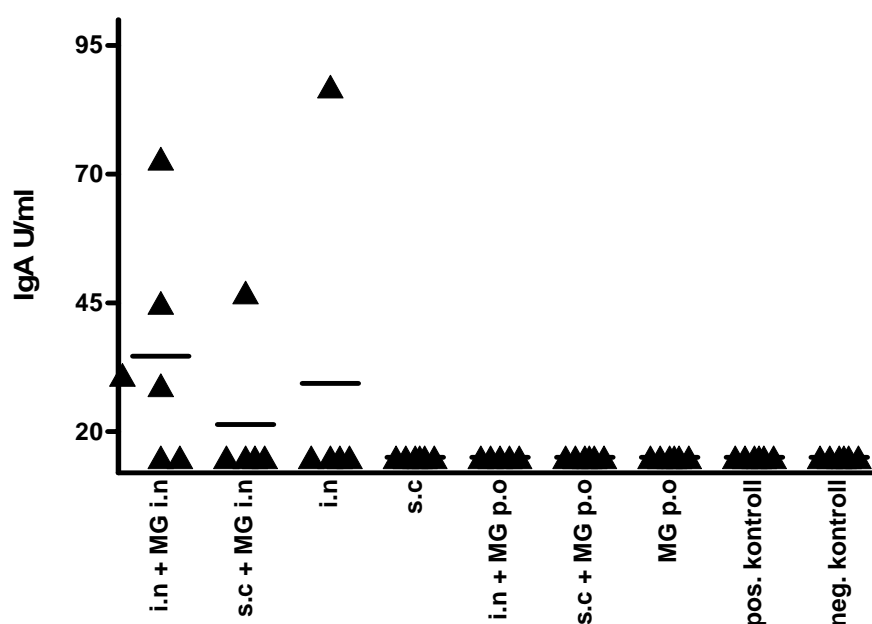


Figur 4.3.3: IgG i serum (U/ml) for de ulike gruppene. Forkortelser: se tekst til figur 4.3.1.

#### 4.3.4. IgA i saliva – alle grupper

For IgA i saliva var det så få mus som viste målbar respons at det ble umulig å beregne statistisk signifikans av resultatene.

Det var kun tre grupper som viste målbare resultater av IgA i saliva: gruppe I (vaksine og MacroGard intranasalt), gruppe II (subcutan vaksine og MacroGard intranasalt) og gruppe III (intranasal vaksine). Gruppe I viste klart høyest produksjon av sekretorisk IgA (Figur 4.3.4). I denne gruppen var det fire mus med målbare verdier i forhold til kun én mus i de to andre gruppene.



**Figur 4.3.4:** Mengde IgA i saliva (U/ml) for de ulike gruppene. Forkortelser: se tekst til Figur 4.3.1.

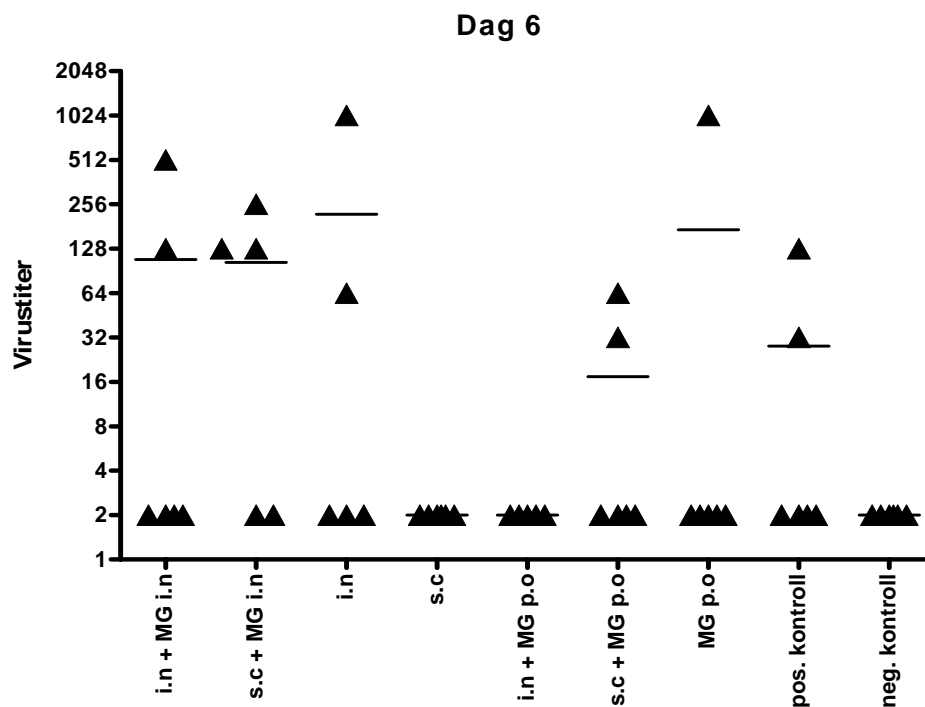
#### 4.3.5. Virustiter i neseseekret – alle grupper

Målinger av virus i neseseekret viste ingen statistisk signifikante forskjeller mellom de smittede gruppene eller innad i disse gruppene på ulike prøvetidspunkt. Det var ingen tegn til virus i gruppen som ikke ble smittet (negativ kontroll), og da grensen for målbart virustiter er  $<2$ , er ikke-målbare verdier i figur 4.3.5 presentert som absoluttverdien 2. Målingene dag 6 etter smitte viste at alle de smittede gruppene hadde noen mus med



målbart virustiter, med unntak av gruppen som kun fikk subcutan vaksine og gruppen som fikk intranasal vaksine og peroral MacroGard (Figur 4.3.5).

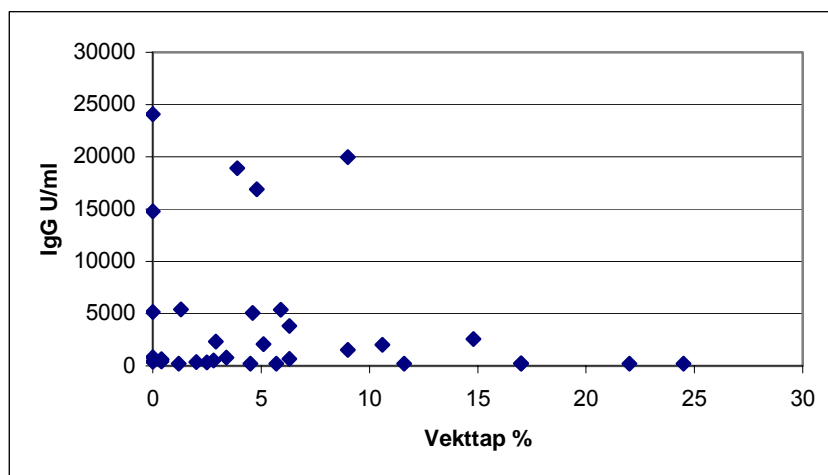
De siste to gruppene hadde imidlertid like høye verdier som de andre gruppene ved målingene som ble gjort fire dager etter smitte. Ved denne målingen var det bare gruppen som hadde fått MacroGard intranasalt og intranasal vaksine som ikke hadde målbart virustiter i nesen. Denne gruppen hadde således utviklet virus til målingen to dager senere.



**Figur 4.3.5: Virustiter hos de ulike gruppene 6 dager etter smitte.** Forkortelser: se figur 4.3.1.

#### 4.4. Effekt av IgG på klinisk sykdom

En eventuell sammenheng mellom mengde IgG i serum og klinisk sykdom ble studert ved å sammenligne IgG og vekttap hos de vaksinerte musene (gruppe I – VI). De høyeste IgG-verdiene i serum ble funnet hos mus med vekttap under 10%. Mus med vekttap over 15% hadde ingen målbare IgG-verdier (Figur 4.4).



**Figur 4.4:** Sammenheng mellom prosentvis vekt nedgang og IgG verdier i serum hos alle vaksinerte mus.

For en nøyere sammenligning av vekttap og IgG, ble musene inndelt i tre grupper etter grad av vekttap: "syke mus" ble betegnet som mus som hadde gått ned mer enn 2 SD, dvs. mer enn 13,3% av kroppsvekten etter smitte, kfr. avsnitt 4.2. Mus som hadde gått ned mindre enn 1% av kroppsvekten etter smitte ble betegnet som "friske". Mus som lå mellom disse gruppene, dvs. med et vekttap  $\leq 13,3\%$  og  $\geq 1\%$  ble satt i gruppen for "mindre syke mus" (Tabell 4.4). Det var ingen signifikant forskjell i serum IgG mellom den "syke" og den "mindre syke" gruppen, eller mellom den "mindre syke" og "friske" gruppen. Forskjellen i serum IgG var imidlertid statistisk signifikant mellom den "syke" og den "friske" gruppen. De "friske" musene hadde alle målbare verdier, og to mus hadde verdier over 10000 U/ml. I den "syke" gruppen var det kun to av fem mus som i det hele tatt har målbare verdier, dvs. over 200 U/ml. Dette viser en sammenheng mellom IgG-verdier og vekttap etter smitte og indikerer derved en sammenheng mellom IgG i serum og klinisk sykdom.

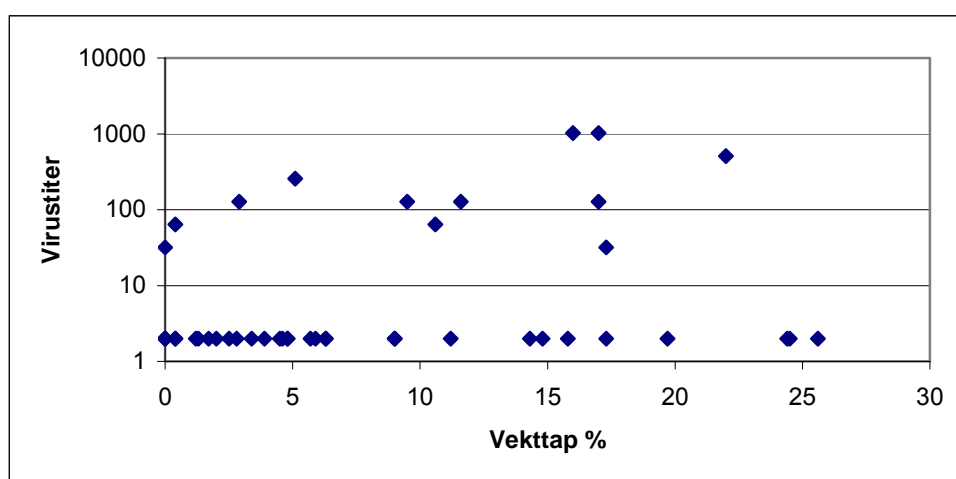
**Tabell 4.4: Vekttap etter smitte vs. IgG i serum**

Medianverdier med spredning i parentes for prosentvis vekttap fra før til etter smitte sammenlignet med IgG (U/ml) i serum før smitte hos alle vaksinerte mus (n = 33) inndelt etter grad av vekttap (se tekst). Forskjell mellom gruppene er oppgitt som P-verdier. i.s. = ikke statistisk signifikant forskjell.  $P^*$  = sammenligning av syke og friske mus

	Vekttap (%)	IgG (U/ml)
Syke mus n = 5	<b>17.0</b> (14,8-24,5)	<b>&lt;200</b> (<200-2562)
<i>P</i>	0,0008	i.s.
Mindre syke mus n = 20	<b>4,7</b> (1,2-11,6)	<b>1777,5</b> (<200-19988)
<i>P</i>	<0,0001	i.s.
Friske mus n = 8	<b>0</b> (0-0,4)	<b>736,5</b> (388-24067)
$P^*$	0,0016	0,03

#### 4.5. Sammenheng mellom virustiter i neseskyllevæske og klinisk sykdom

Som for IgG var det ønskelig å se om det var noen sammenheng mellom virustiter i neseskyllevæsken og grad av klinisk sykdom. I denne sammenligningen ble det sett på alle mus som var blitt smittet (gruppe I – VIII) og dermed kunne ha utviklet sykdom. Det ble ikke funnet noen klar sammenheng mellom virustiter og vekttap hos alle smittede mus sett under ett, men det var et noe større antall ikke-målbare verdier (satt til absoluttverdi 2) hos mus med liten vektnedgang (Figur 4.5).



**Figur 4.5: Sammenheng mellom virustiter i neseskyllevæske og prosentvis nedgang i vekt for alle mus i gruppene som ble smittet.**

Ved å bruke den samme grupperingen av syke, mindre syke og friske mus som for sammenligningen med IgG-verdier (avsnitt 4.4), ble sammenhengen mellom virustiter i neseskyllevæske og grad av sykdom nærmere undersøkt. Alle mus som var blitt smittet, ble inkludert i sammenligningen (Tabell 4.5). Det var langt flere mus som hadde målbare verdier av virustiter (titer >2) i gruppen med syke mus (seks av 13 mus) i forhold til de friske musene (to av åtte mus). Det er imidlertid ingen signifikante forskjeller mellom noen av gruppene vedrørende virustiter.

**Tabell 4.5: Vekttap vs. virustiter i neseskyllevæske etter smitte**

Medianverdier (spredning i parentes) for prosentvis vekttap fra før til etter smitte og virustiter seks dager etter smitte hos alle smittede mus (n = 45) inndelt etter grad av vekttap. "Syke mus": vekttap > 13,3% av kroppsvekt for alle mus, "mindre syke mus": vekttap ≤ 13,3%, ≥ 1%, "friske mus": vekttap < 1% av kroppsvekten. Forskjell mellom gruppene er oppgitt som P-verdier. i.s. = ikke signifikant forskjell. P\* = sammenligning av syke og friske mus.

	Vekttap (%)	Virustiter
Syke mus n = 13	<b>17.3</b> (14,8-25,6)	<b>&lt;2</b> (<2-1024)
<i>P</i>	<i>&lt;0,0001</i>	<i>i.s.</i>
Mindre syke mus n = 24	<b>5,4</b> (1,2-11,6)	<b>&lt;2</b> (<2-256)
<i>P</i>	<i>&lt;0,0001</i>	<i>i.s.</i>
Friske mus n = 8	<b>0</b> (0-0,4)	<b>&lt;2</b> (<2-46)
<i>P*</i>	<i>0,0002</i>	<i>i.s.</i>

## 4.6. Effekt av intranasal vaksine vs. subcutan vaksine

For å sammenligne effektene av intranasal og subcutan vaksine ble alle mus som hadde fått den ene type vaksine (gruppe I, III og V) sammenlignet med alle mus som hadde fått den andre type vaksine (gruppe II, IV og VI). Det ble her ikke tatt hensyn til hvorvidt musene hadde fått MacroGard. Subcutan vaksine gav signifikant høyere verdier av IgG i serum enn intranasal vaksine (Tabell 4.6.A).

**Tabell 4.6.A: IgG i serum ved intranasal vs. subcutan vaksine**

Medianverdier med spredning i parentes for IgG i serum (U/ml) før smitte (dag -7) hos mus som fikk vaksine (INV) intranasalt (i.n) eller subcutant (s.c). Forskjell mellom gruppene er oppgitt som P-verdier.

Før smitte	
INV i.n n = 16	<b>358,5</b> (<200-24067)
<i>P</i>	0,027
INV s.c n = 17	<b>2330</b> (<200-18920)

Begge gruppene gikk signifikant ned i vekt etter smitte, men det var ingen signifikant forskjell i vekt mellom gruppene før eller etter smitte (Tabell 4.6.B). For kroppstemperatur var det heller ingen signifikante forskjeller mellom gruppene.

**Tabell 4.6.B: Vekt ved intranasal vs. subcutan vaksine**

Medianverdier med spredning i parentes for vekt i gram 7 dager før smitte og 6 dager etter smitte hos mus som fikk vaksine (INV) intranasalt (i.n) eller subcutant (s.c). Forskjell mellom gruppene og forskjell mellom ulike prøvetidspunkt er oppgitt som P-verdier. I.s = ikke statistisk signifikant forskjell.

	Før smitte	<i>P</i>	Etter smitte
INV i.n n = 16	<b>25,1</b> (21,2-27,9)	0,006	<b>23,9</b> (19,0-27,5)
<i>P</i>	<i>i.s.</i>		<i>i.s.</i>
INV s.c n = 17	<b>24,6</b> (21,0-26,3)	0,027	<b>23,7</b> (17,4-26,0)

## 4.7. Effekt av MacroGard intranasalt

### 4.7.1. MacroGard i blanding med intranasal vaksine

Musene som fikk MacroGard intranasalt kombinert med intranasal vaksine, hadde før smitte betydelig lavere medianverdi av IgG i serum enn musene som bare fikk intranasal vaksine (Tabell 4.7.1.A, Figur 4.3.3). I den første gruppen hadde bare fire av seks mus målbare serumverdier, mens i den andre gruppen var alle serumverdiene målbare. Det var likevel ingen statistisk signifikant forskjell mellom de to gruppene. Det var imidlertid en større forskjell fra den positive kontrollen (som ikke hadde målbare verdier) hos gruppen som ikke hadde fått MacroGard, noe som bekrefter at det i denne gruppen var høyere verdier av IgG enn i gruppen som hadde fått MacroGard i blanding med vaksinen.

**Tabell 4.7.1.A: IgG i serum ved intranasal vaksine uten og med MacroGard**

Medianverdier med spredning i parentes for IgG i serum (U/ml) før smitte (dag -7) hos mus som fikk vaksine (INV) intranasalt (i.n.) alene eller i blanding med MacroGard (MG). Forskjell mellom gruppene er oppgitt som P-verdier. i.s. = ikke statistisk signifikant forskjell. P\* = gruppen sammenlignet med positiv kontroll.

	Før smitte	P*
INV i.n + MG i.n n = 6	<b>396</b> (<200-5071)	0,03
P	i.s.	
INV i.n n = 5	<b>2015</b> (258-24067)	<0,009

Gruppen som fikk MacroGard hadde en statistisk signifikant reduksjon av kroppsvekten fra før til etter smitte (Tabell 4.7.1.B). Det var ingen statistisk signifikant endring av kroppsvekten i gruppen som ikke fikk MacroGard og heller ingen signifikant forskjell mellom de to gruppene før eller etter smitte. Den positive kontrollgruppen hadde et signifikant fall i vekt etter smitte (Figur 4.3.1 og Tabell 4.8.3.A), men det var likevel ingen signifikant forskjell i vekt etter smitte mellom kontrollen og disse to gruppene.

**Tabell 4.7.1.B: Vekt ved intranasal vaksine uten og med MacroGard**

Medianverdier med spredning i parentes for vekt i gram 7 dager før smitte og 6 dager etter smitte hos mus som fikk vaksine (INV) intranasalt (i.n) alene eller i blanding med MacroGard (MG). Forskjell mellom gruppene og forskjell mellom ulike prøvetidspunkt innen samme gruppe er oppgitt som P-verdier. i.s. = ikke statistisk signifikant forskjell. *P\** = gruppen sammenlignet med positiv kontroll etter smitte.

	Før smitte	<i>P</i>	Etter smitte	<i>P*</i>
INV i.n + MG i.n n = 6	<b>24,2</b> (22,8-25,9)	0,03	<b>23,4</b> (18,4-24,7)	i.s.
<i>P</i>	i.s.		i.s.	
INV i.n n = 5	<b>25,4</b> (21,0-26,3)	i.s.	<b>23,8</b> (17,4-26,0)	i.s.

Ingen av gruppene som ble vaksinert gikk signifikant ned i temperatur. Gruppen som bare ble smittet (positiv kontroll) viste imidlertid et signifikant temperaturfall (Tabell 4.8.3.B). De to vaksinerte gruppene hadde således en signifikant høyere temperatur enn den positive kontrollen etter smitte.



#### 4.7.2. MacroGard intranasalt med subcutan vaksine

Det var ingen signifikante forskjeller i IgG-produksjonen mellom gruppene som fikk subcutan vaksine med eller uten MacroGard intranasalt (Tabell 4.7.2.A). Begge gruppene hadde signifikant høyere IgG-verdier enn den positive kontrollen (som ikke hadde målbare verdier).

**Tabell 4.7.2.A: IgG i serum ved subcutan vaksine uten og med MacroGard**

Medianverdier med spredning i parentes for IgG i serum (U/ml) før smitte (dag -7) hos mus som fikk vaksine (INV) subcutant (s.c) alene eller med MacroGard (MG) intranasalt (i.n). Forskjell mellom gruppene er oppgitt som P-verdier. i.s. = ikke statistisk signifikant forskjell. P\*: gruppen sammenlignet med positiv kontroll

	Før smitte	P*
INV s.c + MG i.n n = 5	<b>2084</b> (<200-18920)	0,015
P	i.s.	
INV s.c n = 6	<b>4601</b> (<200-19988)	0,008

Gruppen som fikk MacroGard viste intet signifikant fall i kroppsvekt fra før til etter smitte (Tabell 4.7.2.B). For vaksinegruppen uten MacroGard var reduksjonen i kroppsvekt signifikant. Etter smitte veide begge vaksinegruppene signifikant mer enn de positive kontrollene.

**Tabell 4.7.2.B: Vekt ved subcutan vaksine uten og med MacroGard**

Medianverdier med spredning i parentes for vekt i gram 7 dager før smitte og 6 dager etter smitte hos mus som fikk vaksine (INV) subcutant (s.c) alene eller med MacroGard (MG) intranasalt (i.n). Forskjell mellom gruppene og forskjell mellom ulike prøvetidspunkt innen samme gruppe er oppgitt som P-verdier. i.s. = ikke statistisk signifikant forskjell. P\*: gruppen sammenlignet med positiv kontroll etter smitte.

	Før smitte	P	Etter smitte	P*
INV s.c + MG i.n n = 5	<b>25,6</b> (24,5-27,9)	i.s.	<b>24,3</b> (20,4-27,5)	0,03
P	i.s.		i.s.	
INV s.c n = 6	<b>26,1</b> (23,5-27,8)	0,03	<b>24,6</b> (23,2-25,4)	0,002

Medianverdien for kroppstemperatur var lavere fra før til etter smittetidspunktet for begge gruppene, og forskjellen var signifikant for gruppen som fikk subcutan vaksine uten MacroGard (Tabell 4.7.2.C). Den positive kontrollgruppen hadde et enda større temperaturfall (Tabell 4.8.3.B), og etter smitte var temperaturen i de to vaksinegruppene signifikant høyere enn i den positive kontrollgruppen.

**Tabell 4.7.2.C: Temperatur ved subcutan vaksine uten og med MacroGard**

Medianverdier med spredning i parentes for kroppstemperatur (°C) 7 dager før smitte og 6 dager etter smitte hos mus som fikk vaksine (INV) subcutant (s.c) alene eller med MacroGard (MG) intranasalt (i.n). Forskjell mellom gruppene og forskjell mellom ulike prøvetidspunkt innen samme gruppe er oppgitt som P-verdier. i.s. = ikke statistisk signifikant forskjell. *P*\*: gruppen sammenlignet med positiv kontroll etter smitte.

	Før smitte	<i>P</i>	Etter smitte	<i>P</i> *
INV s.c + MG i.n N = 5	<b>38,4</b> (38,0-38,7)	<i>i.s.</i>	<b>37,7</b> (37,0-38,7)	0,0087
<i>P</i>	<i>i.s.</i>		<i>i.s.</i>	
INV s.c n = 6	<b>38,7</b> (37,7-39,2)	0.03	<b>37,1</b> (35,9-38,5)	0,026

### 4.7.3. MacroGard intranasalt uavhengig av vaksine

Effekten av MacroGard intranasalt på IgG i serum, kroppsvekt og temperatur ble også evaluert ved å slå sammen to og to grupper og dermed sammenligne begge grupper som hadde fått MacroGard intranasalt (gruppe I og II) med de to gruppene som hadde fått samme type vaksine, intranasalt og subcutant, uten MacroGard (gruppe III og IV). Med hensyn til serum IgG før smitte var det ingen signifikante forskjeller mellom gruppene (Tabell 4.7.3.A).

**Tabell 4.7.3.A: IgG i serum ved vaksine uten eller med intranasal MacroGard**

Medianverdier med spredning i parentes for IgG i serum (U/ml) før smitte (dag -7) hos mus som fikk vaksine (INV) subcutant (s.c) eller intranasalt (i.n) sammen med MacroGard (MG) intranasalt og mus som kun fikk vaksine intranasalt eller subcutant. Forskjell mellom gruppene er oppgitt som P-verdier. i.s. = ikke statistisk signifikant forskjell.

Før smitte	
INV i.n, INV s.c + MG i.n n = 11	<b>421</b> (<200-18920)
<i>P</i>	<i>i.s.</i>
INV i.n, INV s.c n = 11	<b>3825</b> (<200-24067)

Begge gruppene viste et signifikant fall i kroppsvekt (p-verdi henholdsvis 0,002 og 0,0186 for gruppen med og uten MacroGard), men det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene.

Gruppene som ikke fikk MacroGard intranasalt sank signifikant i temperatur etter smitte, og de hadde også signifikant lavere temperatur på dette tidspunktet enn gruppene som har fått MacroGard (Tabell 4.7.3.B).

**Tabell 4.7.3.B: Temperatur ved vaksine uten eller med intranasal MacroGard**

Medianverdier med spredning i parentes for kroppstemperatur (°C) 7 dager før smitte og 6 dager etter smitte hos mus som fikk vaksine (INV) subcutant (s.c) eller intranasalt (i.n) sammen med MacroGard (MG) intranasalt og mus som kun fikk vaksine intranasalt eller subcutant. Forskjell mellom gruppene og forskjell mellom ulike prøvetidspunkt innen samme gruppe er oppgitt som P-verdier. i.s. = ikke statistisk signifikant forskjell.

	Før smitte	<i>P</i>	Etter smitte
INV i.n, INV s.c + MG i.n n = 11	<b>38,4</b> (38,0-38,9)	<i>i.s.</i>	<b>37,7</b> (36,0-39,0)
<i>P</i>	<i>i.s.</i>		0,028
INV i.n, INV s.c n = 11	<b>38,5</b> (37,7-39,2)	0,001	<b>37</b> (35,2-38,5)

## 4.8. Effekt av MacroGard peroralt

### 4.8.1. MacroGard peroralt i kombinasjon med intranasal vaksine

Gruppen som fikk MacroGard peroralt, hadde signifikant lavere verdi av serum IgG enn den vaksinerte gruppen som ikke fikk MacroGard (Tabell 4.8.1.A, Figur 4.3.3).

**Tabell 4.8.1.A: IgG i serum ved intranasal vaksine uten og med peroral MacroGard**

Medianverdier med spredning i parentes for IgG i serum (U/ml) før smitte (dag -7) hos mus som fikk vaksine (INV) intranasalt (i.n) alene eller i kombinasjon med MacroGard (MG) peroralt (p.o) over tid (7 uker). Forskjell mellom gruppene er oppgitt som P-verdier. i.s = ikke statistisk signifikant forskjell. P\*: gruppen sammenlignet med positiv kontroll.

	Før smitte	P*
INV i.n + MG p.o n =5	<b>&lt;200</b> (<200-656)	<i>i.s.</i>
P	0,03	
INV i.n n = 5	<b>2015</b> (258-24067)	0.005

De to vaksinerte gruppene viste ingen signifikant endring av kroppsvekten fra før til etter smitte, men gruppen som fikk MacroGard peroralt hadde signifikant høyere vekt etter smitte enn den positive kontrollgruppen (Tabell 4.8.1.B).

**Tabell 4.8.1.B: Vekt ved intranasal vaksine uten og med peroral MacroGard**

Medianverdier med spredning i parentes for vekt i gram 7 dager før smitte og 6 dager etter smitte hos mus som fikk vaksine (INV) intranasalt (i.n), alene eller i kombinasjon med MacroGard (MG) peroralt (p.o) over tid (7 uker). Forskjell mellom gruppene og forskjell mellom ulike prøvetidspunkt innen samme gruppe er oppgitt som P-verdier. i.s. = ikke statistisk signifikant forskjell. P\*: gruppen sammenlignet med positiv kontroll etter smitte.

	Før smitte	P	Etter smitte	P*
INV i.n + MG p.o n = 5	<b>24,5</b> (23,7-25,8)	<i>i.s.</i>	<b>23,1</b> (20,5-25,7)	0,03
P	<i>i.s.</i>		<i>i.s.</i>	
INV i.n n =5	<b>25,4</b> (21,0-26,3)	<i>i.s.</i>	<b>23,8</b> (17,4-26,0)	<i>i.s.</i>

Kroppstemperaturen viste heller ingen signifikant endring fra før til etter smitte i de to vaksinerte gruppene, og begge gruppene hadde signifikant høyere temperatur etter smitte enn den positive kontrollgruppen.

#### 4.8.2. MacroGard peroralt i kombinasjon med subcutan vaksine

Gruppen som fikk MacroGard peroralt kombinert med subcutan vaksine, ble sammenlignet med gruppen som bare fikk subcutan vaksine. Selv om gruppen som fikk MacroGard peroralt hadde en større signifikant forskjell fra den positive kontrollen enn gruppen som kun fikk vaksine, var det ingen signifikante forskjeller mellom de to gruppene med hensyn IgG i serum før smitte (Tabell 4.8.2.A). Tallene viser heller ingen store forskjeller mellom de to gruppene.

**Tabell 4.8.2.A: IgG i serum ved subcutan vaksine uten og med peroral MacroGard**  
Medianverdier med spredning i parentes for IgG i serum (U/ml) før smitte (dag -7) hos mus som fikk vaksine (INV) subcutant (s.c) alene eller i kombinasjon med MacroGard (MG) peroralt (p.o) over tid (7 uker). Forskjell mellom gruppene er oppgitt som P-verdier. i.s = ikke statistisk signifikant forskjell. P\*: gruppen sammenlignet med positiv kontroll.

	før smitte	P*
INV s.c + MG p.o n = 6	<b>1690</b> (569-16892)	<0,005
P	i.s.	
INV s.c n = 6	<b>4601</b> (<200-19988)	0,02

Gruppen som fikk peroralt MacroGard hadde ingen signifikant endring i kroppsvekt fra før til etter smitte, og vekten etter smitte var heller ikke signifikant forskjellig fra vekten i den positive kontrollgruppen etter smitte (Tabell 4.8.2.B). Gruppen som fikk subcutan vaksine uten MacroGard hadde derimot et signifikant vekttap fra før til etter smitte, men hadde likevel en signifikant høyere vekt enn den positive kontrollgruppen etter smitte. Dette skyldtes at vekten før smitte var signifikant høyere i gruppen som fikk subcutan vaksine

uten MacroGard, både i forhold til gruppen som fikk subcutan vaksine med MacroGard (Tabell 4.8.2.B) og i forhold den positive kontrollgruppen (Tabell 4.8.3.A).

**Tabell 4.8.2.B: Vekt ved subcutan vaksine uten og med peroral MacroGard**

Medianverdier med spredning i parentes for vekt i gram 7 dager før smitte og 6 dager etter smitte hos mus som fikk vaksine (INV) subcutant (s.c) alene eller i kombinasjon med MacroGard (MG) peroralt (p.o) over tid (7 uker). Forskjell mellom gruppene og forskjell mellom ulike prøvetidspunkt innen samme gruppe er oppgitt som P-verdier. i.s. = ikke statistisk signifikant forskjell. P\*: gruppen sammenlignet med positiv kontroll etter smitte.

	Før smitte	P	Etter smitte	P*
INV s.c + MG p.o n = 6	<b>24,0</b> (21,2-25,1)	<i>i.s.</i>	<b>23,2</b> (19,0-25,4)	<i>i.s.</i>
P	0,015		<i>i.s.</i>	
INV s.c n = 6	<b>26,1</b> (23,5-27,8)	0,03	<b>24,6</b> (23,2-25,4)	0,002

Kroppstemperaturen viste ingen signifikant endring fra før til etter smitte i gruppen som fikk MacroGard, men falt signifikant i gruppen som bare fikk subcutan vaksine (Tabell 4.8.2.C). Etter smitte hadde begge gruppene signifikant høyere temperatur enn den positive kontrollgruppen.

**Tabell 4.8.2.C: Temperatur ved subcutan vaksine uten og med peroral MacroGard**

Medianverdier med spredning i parentes for temperatur (°C) 7 dager før smitte og 6 dager etter smitte hos mus som fikk vaksine (INV) subcutant (s.c) alene eller i kombinasjon med MacroGard (MG) peroralt (p.o) over tid (7 uker). Forskjell mellom gruppene og forskjell mellom ulike prøvetidspunkt innen samme gruppe er oppgitt som P-verdier. i.s. = ikke statistisk signifikant forskjell. P\*: gruppen sammenlignet med positiv kontroll etter smitte.

	Før smitte	P	Etter smitte	P*
INV s.c + MG p.o n = 6	<b>38,3</b> (37,7-39,0)	<i>i.s.</i>	<b>37,6</b> (37,2-38,4)	0,002
P	<i>i.s.</i>		<i>i.s.</i>	
INV s.c n = 6	<b>38,7</b> (37,7-39,2)	0,03	<b>37,1</b> (35,9-38,5)	0,026

### 4.8.3. MarcoGard peroralt uten vaksine

Effekten av MacroGard gitt peroralt uten vaksine ble studert ved å måle kroppsvekt og kroppstemperatur før og etter smitte og sammenligne dette med tilsvarende målinger i den positive og negative kontrollgruppen. Da det ikke ble gitt vaksine til disse gruppene, var det heller ingen målbare IgG-verdier.

Begge gruppene som ble smittet, hadde et signifikant fall i kroppsvekt, og begge hadde også signifikant lavere vekt etter smitte enn den negative kontrollen på samme tidspunkt (Tabell 4.8.3.A).

**Tabell 4.8.3.A: Vekt ved peroral MacroGard uten vaksine**

Medianverdier med spredning i parentes for vekt i gram 7 dager før smitte og 6 dager etter smitte hos mus som fikk MacroGard (MG) peroralt (p.o) over tid (7 uker) og mus som kun ble smittet (positiv kontroll). Forskjell mellom gruppene og forskjell mellom ulike prøvetidspunkt innen samme gruppe er oppgitt som P-verdier. i.s. = ikke statistisk signifikant forskjell.  $P^*$  = gruppen sammenlignet med negativ kontroll etter smitte.

	Før smitte	$P$	Etter smitte	$P^*$
MG p.o n = 6	<b>25,6</b> (23,9-25,8)	0,03	<b>20,9</b> (19,5-22,9)	0,002
$P$	i.s.		i.s.	
Pos. kontroll n = 6	<b>24,6</b> (20,2-26,6)	0,03	<b>20,4</b> (17,0-22,7)	0,002



Det var også et signifikant fall i temperatur for begge smittede grupper, og kroppstemperaturen var signifikant lavere enn i den negative kontrollgruppen etter smitte i begge grupper (Tabell 4.8.3.B). Det var imidlertid ingen signifikante forskjeller mellom de to smittede gruppene.

**Tabell 4.8.3.B: Temperatur ved peroral MacroGard uten vaksine**

Medianverdier med spredning i parentes for kroppstemperatur (°C) 7 dager før smitte og 6 dager etter smitte hos mus som fikk MacroGard (MG) peroralt (p.o) over tid (7 uker) og mus som kun ble smittet (positiv kontroll). Forskjell mellom gruppene og forskjell mellom ulike prøvetidspunkt innen samme gruppe er oppgitt som P-verdier. i.s. = ikke statistisk signifikant forskjell. P\*: gruppen sammenlignet med negativ kontroll etter smitte.

	Før smitte	P	Etter smitte	P*
MG p.o n = 6	<b>38,5</b> (38,0 – 38,9)	0,03	<b>34,0</b> (33,4 – 34,2)	0,002
P	i.s.		i.s.	
Pos. kontroll n = 6	<b>38,2</b> (36,9 – 39,2)	0,03	<b>34,9</b> (32,0 – 38,5)	0,009

## 5. DISKUSJON

### 5.1. Kriterier for klinisk sykdom

Når man skal vurdere hvorvidt en vaksine eller adjuvans beskytter mot smitte og sykdomsutvikling hos forsøksdyr, er det av stor betydning å kunne fastslå om dyrene er blitt syke eller ikke. I dette forsøket med mus benyttet vi oss dels av direkte observasjon av dyrene, dels av måling av vekt og temperatur etter smitte med en kjent dose influensavirus. Observasjon alene viste tydelige sykdomstegn hos en del av dyrene som ble smittet, og det var en markert forskjell mellom vaksinerte og ikke-vaksinerte dyr med hensyn til tegn på sykdom. Forandringer som nedsatt aktivitet, pjuskete pels og magert utseende er imidlertid kriterier som er vanskelige å kvantitere, og for en mer objektiv måling av sykdomsgrad baserte vi oss på måling av kroppsvekt og kroppstemperatur. Vekt og temperatur er i tidligere forsøk vist å kunne brukes som mål på klinisk sykdom hos mus (22,24), og begge er godt innarbeidede parametere i musemodeller for influensainfeksjon (20). I dette forsøket var det god overensstemmelse mellom inntrykk av sykdom og objektiv registrering av vekttap etter smitte. Mus som var blitt vaksinert før smitte, virket mindre syke og gikk mindre ned i vekt enn mus som ikke hadde fått vaksine, og gruppen som ikke var blitt smittet viste ikke tegn på sykdom og gikk heller ikke signifikant ned i vekt. Grad av vekttap syntes derfor å være en relativt robust parameter for mål på klinisk sykdom.

Fall i kroppstemperatur er et tidligere benyttet kriterium for klinisk sykdom hos mus, men i dette forsøket viste temperaturfall dårligere sammenheng med subjektivt inntrykk av sykdom enn vekttap. Veldig syke mus hadde generelt lavere temperaturer, men ellers var det vanskelig å si noe generelt om musenes tilstand ut fra temperaturmålinger alene. Gruppen som ikke ble smittet, hadde også en signifikant nedgang i temperatur etter smitte, men uten signifikant vekttap. Vi fant på denne måten dårlig overensstemmelse mellom to ulike mål for klinisk sykdom. Det var langt flere mus som ble betegnet som syke når de ble valgt ut på bakgrunn av temperaturnedgang enn når de ble valgt ut etter vekttap. Gruppen som var syk ut fra temperaturfall hadde dessuten et signifikant mindre vekttap enn gruppen som var syk ut fra vekttap. Ettersom disse to kriteriene for sykdom gir så forskjellig resultat, er den rimelig å anta at en av parametrene må være mindre pålitelig enn den andre

for måling av klinisk sykdom. Det så ut som temperatur var mer utsatt for raske svinginger enn vekt og at den, i motsetning til vekt, påvirkes av mange utenforliggende faktorer så som varigheten av musenes opphold utenfor dyrerommet i forbindelse med målingene, hvilken rekkefølge de ble målt i, hvor stresset de ble av målingen etc. Det var i tillegg tekniske vanskeligheter forbundet med måling av temperatur med skanner. På bakgrunn av ovenstående forhold måtte vi konkludere at målt kroppstemperatur i dette forsøket var mindre pålitelig enn vekt som mål på klinisk sykdom. I vår vurdering av ulike parameters effekt på klinisk sykdom valgte vi derfor å benytte vekttap som kriterium for sykdom.

## **5.2. Statistisk signifikans**

Pga. det lave antall forsøksdyr i hver gruppe brukte vi ikke-parametriske metoder for å beregne statistisk signifikans. Dette betyr at det er plasseringen av verdiene i forhold til hverandre som har noe å si, ikke selve måleverdiene. Er det overlapp av verdier i to grupper som sammenlignes, vil det føre til mindre sannsynlighet for signifikans. Siden vi har så få mus i hver gruppe vil vi ofte få signifikans kun dersom ingen verdier overlapper hverandre. Derfor har jeg i enkelte tilfeller lagt mindre vekt på signifikans dersom tallene viser at det likevel er stor forskjell på gruppene eller omvendt. Til senere oppgaver vil det derfor være en fordel å bruke flere dyr i hver gruppe.

## **5.3. Effekt av vaksinen**

Målingene av antistoffer i serum og saliva ga svært lave verdier i forhold til tidligere forsøk gjort med samme type vaksine ved Folkehelseinstituttet (24). Dette tyder på at vaksinen var for svak til å kunne indusere antistoffproduksjon i alle mus. Viruset som ble benyttet til vaksine og smitte, er nytt til bruk for vaksineproduksjon, og den optimale doseringen er derfor ikke kjent. Mengden formalin som ble brukt til inaktivering kan ha vært for høy og derved gitt en mindre aktiv vaksine enn ønskelig. I tillegg ble alt arbeid med virus – oppsamling, inaktivering og tillaging av vaksiner – utført av studentene ansvarlig for disse to hovedoppgavene, som aldri hadde gjort dette før.

Gruppene som fikk vaksine, med eller uten peroral MacroGard, ble mindre syke enn gruppene som kun ble smittet. Vaksinen kan derfor sies å ha hatt effekt på beskyttelse mot sykdom. I tillegg hadde alle de vaksinerte gruppene målbare IgG-verdier i serum, noe som ikke var å finne hos ikke-vaksinerte grupper. Dette betyr at vaksinen også hadde effekt på immunresponsen ved å stimulere til produksjon av antistoffer i serum. Sammenligning av grupper som fikk subcutan vaksine og grupper som fikk intranasal vaksine viste at IgG-produksjonen var signifikant større hos mus som var blitt vaksinert subcutant, noe også andre forsøk har vist (24). Det var imidlertid ingen forskjell i beskyttelse mot sykdom mellom mus som var blitt vaksinert subcutant og mus som var blitt vaksinert intranasalt. Ved å se på alle musene under ett, fant vi en sammenheng mellom IgG-produksjon og grad av sykdom etter smitte. De høyeste IgG-verdiene i serum ble funnet hos de friskeste dyrene, bedømt ut fra vekttap. De sykeste dyrene (ut fra vekttap) hadde ingen målbare IgG-verdier. Dette indikerer at antistoffproduksjonen induert av vaksine bidro til beskyttelse mot sykdom.

Når det gjelder sammenhengen mellom virusreplikasjon i nesen og grad av sykdom, fant vi ingen signifikante forskjeller mellom syke og friske mus slik som for IgG, og det var heller ingen signifikante forskjeller mellom noen av de smittede gruppene. Dette forsøket ga derfor ikke svar på om vaksinene kan beskytte mot virusreplikasjon i nesen.

Tidligere forsøk har vist at intranasal vaksine gir en sterk IgA respons i saliva (24). Dette ble ikke funnet i dette forsøket, der det bare var et par grupper som viste svak IgA-produksjon i saliva. Dette er nok et tegn på at vaksinen trolig var for svak og derfor ikke effektiv nok i indusering av antistoffproduksjon.

#### **5.4. Effekt av MacroGard**

Musene i gruppen som hadde fått vaksine i blanding med MacroGard, hadde betydelig lavere IgG-verdier enn gruppen som kun hadde fått vaksine. Dette tyder på at MacroGard hadde dempet produksjonen av antistoffer. Det var imidlertid ingen forskjell mellom disse

to gruppene med hensyn til vekt og temperatur, hvilket indikerer at lavere IgG-nivå som følge av MacroGard intranasalt ikke førte til mindre motstand mot sykdom.

Ser vi på effekten av MacroGard intranasalt med subcutan vaksine, finner vi ingen forskjell i IgG-nivå mellom gruppen som fikk MacroGard og gruppen som kun fikk subcutan vaksine. Det var heller ingen forskjeller i vekt og temperatur. Dette betyr at vaksinene beskyttet mot sykdom og induerte IgG-produksjon helt uavhengig av intranasal MacroGard. Det faktum at MacroGard intranasalt gitt i blanding med intranasal vaksine påvirket antistoffproduksjonen kunne derfor tenkes å bero på en interaksjon mellom vaksinen og MacroGard.

Når MacroGard ble gitt peroralt sammen med intranasal vaksine fant vi imidlertid akkurat de samme resultatene som når MacroGard var blitt gitt intranasalt med intranasal vaksine; mindre IgG-produksjon – denne gangen en signifikant forskjell - og ingen forskjell i beskyttelse mot sykdom i forhold til kun vaksinerings. Dette betyr at MacroGard har en dempende effekt på IgG-produksjon ved intranasal vaksinerings, uansett om MacroGard blir gitt intranasalt eller peroralt. Effekten kan derfor ikke skyldes en interaksjon med vaksinen.

Som omtalt over, ble det funnet en generell sammenheng mellom IgG-verdier i serum og grad av klinisk sykdom: høyest IgG-verdier hos de friskeste og lavest IgG-verdier hos de sykeste musene. IgG-produksjon i seg selv synes altså å beskytte mot sykdom. Det kan derfor synes underlig at den reduserte IgG-produksjonen forårsaket av MacroGard ikke gav redusert beskyttelse mot sykdom. Dette tilsynelatende paradoks tyder på at MacroGard sammen med intranasal vaksine har en annen mekanisme for beskyttelse mot sykdom enn via antistoffproduksjon. Forsøk ved Folkehelseinstituttet (Bjørn Haneberg, personlig meddelelse) har vist at partikulært MacroGard i blanding med intranasal inaktivert influensavaksine øker den cellulære immunresponsen, men ikke antistoffproduksjon. Det kan derfor være at MacroGard styrer immunresponsen mot en T-celle-respons, noe som kan være grunnen til beskyttelsen mot sykdom på tross av mindre antistoffnivå i serum.

Selv om MacroGard i kombinasjon med intranasal vaksine ser ut til å ha en dempende effekt på IgG-produksjon, var det motsatte tilfellet for IgA-produksjon i saliva. Gruppen

som fikk MacroGard og vaksine i blanding intranasalt hadde nemlig den klart høyeste produksjonen av IgA i saliva. Dette gjaldt imidlertid kun for MacroGard gitt intranasalt i blanding med vaksinen, ikke for peroral MacroGard. Det kan se ut som om MacroGard i denne formen kan øke produksjon av IgA i saliva. Tidligere forsøk har vist at intranasal influensavaksine i blanding med adjuvans gir høyere IgA produksjon i saliva (24). MacroGard kan derfor sies å virke som en adjuvans på dette punktet. Det samme forsøket viste også at IgA i saliva beskytter mot virusreplikasjon i nesen, men at IgA i saliva ikke beskytter mot klinisk sykdom. I gruppen som fikk MacroGard i blanding med intranasal vaksine, var det riktignok ingen virusreplikasjon fire dager etter smitte, men seks dager etter smitte hadde to mus målbart virustiter på linje med de andre smittede gruppene. IgA i saliva kan derfor ikke sies å beskytte mot virusreplikasjon i nesen i dette forsøket. En mulig grunn til dette kan imidlertid være at IgA-nivåene var for lave til å kunne gi beskyttelse.

Som nevnt over hadde MacroGard gitt intranasalt sammen med subcutan vaksine ingen effekt verken på IgG-produksjon eller beskyttelse mot sykdom. Dette var også tilfellet for MacroGard gitt peroralt sammen med subcutan vaksine. Sammenlignet med gruppen som kun hadde fått subcutan vaksine var det ingen merkbare forskjeller som kunne tillegges MacroGard. I motsetning til ved intranasal vaksine, er det i dette forsøket ikke mulig å finne noen effekt av MacroGard, enten det ble gitt intranasalt eller peroralt, sammen med subcutan vaksine.

Ut fra tidligere forsøk skulle man forventet at MacroGard gitt som kosttilskudd gav en bedre beskyttelse mot sykdom og mindre vektnedgang etter smitte. Dette var ikke tilfelle i dette forsøket. Peroral MacroGard gitt alene gav ingen forskjeller fra den positive kontrollen når det gjaldt vekttap og temperaturnedgang, begge gruppene ble påfallende syke. Virustiter i neseskyllevæsken lå muligens noe høyere for gruppen som har fått MacroGard enn for den positive kontrollen, men det er for få data til å trekke noen konklusjoner ut fra dette om at MacroGard eventuelt kunne ha hatt en slik negativ effekt.

## 6. KONKLUSJON

Vekttap etter smitte så ut til å kunne brukes som mål på klinisk sykdom hos mus, i motsetning til temperatur. Vaksinen induserte produksjon av IgG i serum samt beskyttet mot sykdom. Subcutan vaksine førte til større produksjon av IgG i serum enn intranasal vaksine, uten at dette hadde noen innvirkning på grad av sykdom etter smitte i forhold til intranasal vaksine.

MacroGard gitt intranasalt i blanding med intranasal influensavaksine eller peroralt over tid i kombinasjon med intranasal influensavaksine hadde en dempende effekt på IgG-produksjon i serum. Dette påvirket imidlertid ikke vaksinens evne til å beskytte mot sykdom. MacroGard gitt sammen med eller samtidig med intranasal vaksine, kan derfor beskytte mot sykdom uavhengig av IgG-produksjon.

MacroGard sammen med subcutan influensavaksine, enten gitt intranasalt eller peroralt over tid hadde ingen effekt verken på IgG-produksjon eller motstand mot sykdom. Heller ikke MacroGard peroralt over tid uten vaksine hadde noen virkning på beskyttelse mot smitte.

MacroGard intranasalt i blanding med intranasal vaksine kan også inducere IgA antistoffer i saliva, men i begrenset mengde. Dette hadde heller ingen innvirkning på musenes allmenntilstand etter smitte.

## 7. KILDER

1. **Folkehelseinstituttets hjemmesider.** Influenza.  
<http://www.fhi.no/artikler/?id=28645> (28.09.04)
2. **Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell**, Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok, 2001
3. **Nicholson KG, Wood JM, Zambon M.** Influenza. Lancet 2003; 362: 1733-45
4. **Palese P, Garcia-Sastre A.** Influenza vaccines: present and future. J Clin Invest 2002; 110(1): 9-13
5. **Prescott LM, Harley JP, Klein DA.** Microbiology. WCB McGraw – Hill, USA, 1999
6. **Iversen B, Fuglesang J, Bjark P, Thrana FS, Borchgrevink CF.** Influenza.  
[http://www.helsenett.no/2\\_16/influenza97okt1.html](http://www.helsenett.no/2_16/influenza97okt1.html) (13.10.2004)
7. **Folkehelseinstituttets hjemmesider.** Fakta om influensavaksine.  
<http://www.fhi.no/artikler/?id=48229> (13.10.04)
8. **Folkehelseinstituttets hjemmesider.** Hva er “antigen skift” hos influensavirus?  
<http://www.fhi.no/artikler/?id=41289> (18.08.04)
9. **Lea T.** Kurs i immunologi, Blindern, januar 2004
10. **Parham P.** The Immune System. Current Trends, London, 2000
11. **Folkehelseinstituttets hjemmesider.** WHO-anbefaling for influensavaksine i 2004-2005. <http://www.fhi.no/artikler/?id=28313>



12. **Haneberg B, Holst J.** Can non living nasal vaccines be made to work?" Expert Rev Vaccine 2002; 1: 89-94
13. **Hvalbye BKR, Aaberge IS, Løvik M, Haneberg B.** Intranasal Immunization with Heat-Inactivated *Streptococcus pneumoniae* Protects Mice against Systemic Pneumococcal Infection. Infect Immun. 1999; 67(9): 4320-25.
14. © **Biotec Phamacon:** Modulation of immune reactions by beta-1,3/1,6-glucan 2003
15. **Seljelid R, Raa J.** Mobilisering av det mesenkymale infeksjonsforsvar. Tidskr Nor Lægeforen 2002; 122(30): 2891-4
16. **Jamas S, Easson D, Ostroff G.** Underivatilized aqueous soluble beta (1,3) glucan, composition and method of making same. U.S. Patent Application 20020032170, March 14, 2002.
17. **Czop JK.** The Role of Beta-Glucan Receptors on Blood and Tissue Leukocytes in Phagocytosis and Metabolic Activation. Pathology and Immunopathology Research 1986; 5: 286-96. Harvard Medical School.
18. **Jordan F, Hunter Jr. KW, Gault R.** Method for preparing small particle size glucan in a dry material. U.S. Patent 6,476,003. November 2002.
19. **Humphreys IR, Walzl G, Edwards L, Rae A, Hill S, Hussel T.** A Critical Role for OX40 in T Cell-mediated Immunopathology during Lung Viral Infection. J Exp Med 2003; 198: 1237-42
20. **Sidwell RW.** The mouse model of influenza virus infection. Handbook of animal models of infection. Academic Press, London, 1999 s. 981-87
21. **Eliassen AH.** Vaksine mot influenza: Betydning av  $\beta$ -glukan for beskyttelse mot infeksjon. Hovedfagsoppgave ved avdeling for Mikrobiologi, Farmasøytisk Institutt, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Universitetet i Oslo, 2003

22. **Buri KF.** Nasal vaksine mot influensa: Betydning av  $\beta$ -glukan for beskyttelse mot infeksjon. Hovedfagsoppgave ved avdeling for Mikrobiologi, Farmasøytisk Institutt, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Universitetet i Oslo, 2003
23. **Janakova L, Bakke H, Haugen IL, Berstad AK, Høiby EA, Aaberge IS, Haneberg B.** Influence of intravenous anesthesia on mucosal and systemic antibody responses to nasal vaccines. *Infect Immun.* 2002; 70(10): 5479-84
24. **Bizanov G, Janakova L, Knapstad SE, Karlstad T, Bakke H, Haugen IL, Haugan A, Samdal HH, Haneberg B.** Immunoglobulin A-Antibodies in Upper Airway Secretions from Mice May Inhibit Nasal Influenza Replication but Not Protect against Clinical Illness. Nasjonalt Folkehelseinstitutt, Oslo, Norge, ikke publisert
25. **Immunology Labs at ScienceWorks for ME**  
<http://www.fbr.org/swksweb/immunolist.html>
26. **Kemeny DM.** A practical guide to ELISA. First edition, Pergamont Press, Oxford, 1991, s. 57-67

## 8. Vedlegg

### Reagenser brukt til ELISA-analysen

#### 1. PBS 0,01M, pH = 7,2:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,74	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0215	g
NaCl	3,40	g
Destillert vann	ad	500 ml

#### 2. ”Coating” med INV, konsentrasjon 10,8 µg/ml:

PR8 influensavaksine	997	µl
PBS 0,01M	360	ml

#### 3. Waaler vaskebuffer, pH = 7,4:

Waaler (20 × konsentrert PBS)	250	ml
Tween 20	2,5	ml
Destillert vann	ad	5000 ml

#### 4. Blokkeringsbuffer:

Skim milk powder (Oxid, Hampshire, England)	5g	
PBS 0.01M	ad	100ml

#### 5. Konjugat:

Sigma Peroxydase-konjugert geit anti-mus IgA, art nr. A-4789

Sigma Peroxydase-konjugert geit anti-mus IgG, art nr. A-9309

#### 6. Substrat:

OPD-(orto-phenyldiamine-dihydrochloride) tabletter	5	mg
0,05M fosfat-citrat buffer	12,5	ml
Perhydrol 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5	µl

7. Fostfat-citrat buffer:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$		46,28	g
Sitronsyre $\times \text{H}_2\text{O}$		25,22	g
Destillert vann	ad	5000	ml

8. Stoppløsning,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1,25M:

$\text{H}_2\text{SO}_4$ 95-97%		383,10	g
Destillert vann	ad	3000	ml